

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina – DIP

DIAGNÓSTICO DA MENINGITE POR *Streptococcus pneumoniae* POR
MEIO DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PNEUMOLISINA (PLY) EM
REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA

JULIANA ARRUDA DE MATOS

Rio de Janeiro
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



DIAGNÓSTICO DA MENINGITE POR *Streptococcus pneumoniae* POR MEIO DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PNEUMOLISINA (PLY) EM REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA

Juliana Arruda de Matos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina - Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina, área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadores: Prof. Dr. David Eduardo Barroso
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Cristina Barroso Hofer
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2007

de Matos, Juliana Arruda

Diagnóstico da meningite por *Streptococcus pneumoniae* por meio da amplificação do gene da pneumolisina (*ply*) em reação da polimerase em cadeia / Juliana Arruda de Matos - Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Medicina, 2007.

xiii, 156 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: David Eduardo Barroso e Cristina Barroso Hofer
Dissertação (Mestrado) – UFRJ, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina – Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2007.

Referências Bibliográficas: f. 129-147

1. *Streptococcus pneumoniae*. 2. Reação da polimerase em cadeia. 3. Meningite. 4. Pneumolisina. 5. Doenças Infecciosas e Parasitárias – Tese. I. Barroso, David Eduardo. II. Hofer, Cristina Barroso. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina – Doenças Infecciosas e Parasitárias. IV. Título.

DIAGNÓSTICO DA MENINGITE POR *Streptococcus pneumoniae* POR
MEIO DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PNEUMOLISINA (PLY) EM
REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA

Juliana Arruda de Matos

Orientadores: Prof. Dr. David Eduardo Barroso
Prof^a. Dr^a. Cristina Barroso Hofer

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Aprovada por:

Presidente, Prof^a. Dr^a.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Rio de Janeiro
Dezembro/2007

Dedico este trabalho aos meus avós Djalma Oliveira Arruda, Lenira Augusta Oliveira Arruda (*in memorian*), José Rodrigues Barbosa e Patrocínia Alves Barbosa (*in memorian*), com carinho.

AGRADECIMENTOS

À Gerência de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, pela disponibilização dos dados epidemiológicos da cidade do Rio de Janeiro.

À Assessoria de Meningites da Secretaria de Estado da Saúde do Rio de Janeiro, pela disponibilização de dados epidemiológicos do Estado do Rio de Janeiro.

À Giovanna Ianini D'Almeida Ferraiuoli e todas as colegas da disciplina de Infectologia da Escola de Medicina Souza Marques, pelo apoio.

À Érika Ferraz Gouveia e todos os colegas residentes e plantonistas do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, que me substituíram nos plantões sempre que foi preciso.

Ao Nelson Macedo Mesquita e toda a equipe do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, pela compreensão.

Aos pacientes e equipe do Centro Municipal de Saúde Manoel José Ferreira, que me apoiaram no início dessa empreitada.

Ao Professor Ronir Raggio Luiz, pela atenção e esclarecimentos na parte de estatística.

À Maria Cristina Rebelo e à sua equipe, pelas informações essenciais sobre os protocolos do Laboratório Estadual de Referência em Meningites, do IEISS.

À Wilma Alves, pelas aulas de informática e de solidariedade.

À Ione Lefevre e Christian Lefevre, pelo socorro no momento mais tenso de todo o processo.

Ao meu pai, Alceu Barbosa de Matos, meu maior incentivador nos estudos, desde sempre.

À minha mãe, Sueli Arruda de Matos, por sua eterna vigilância e carinho.

À Helena de Carvalho Fennel, pelo seu incentivo e exemplo.

Ao Bruno dos Santos Vilhena Pereira, pela paciência, carinho, cumplicidade, amor, enfim, por tudo.

À Renata Nunes Aranha, por ser a amiga que é, e pela indispensável ajuda técnica e logística, meu agradecimento muito especial.

A todos aqueles que de alguma maneira me ajudaram a concluir essa etapa, muito obrigada.

RESUMO

DIAGNÓSTICO DA MENINGITE POR *Streptococcus pneumoniae* POR MEIO DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PNEUMOLISINA (*PLY*) EM REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA

Juliana Arruda de Matos

Orientadores: Prof. Dr. David Eduardo Barroso
Prof^a. Dr^a. Cristina Barroso Hofer

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

O diagnóstico de meningite bacteriana é tradicionalmente baseado nos métodos de bacterioscopia pela coloração de Gram, pesquisa de antígeno pela aglutinação de látex e cultura do líquido cefalorraquidiano (LCR). O desempenho desses métodos, especialmente da bacterioscopia e da cultura, é prejudicado pela dificuldade em detectar bactérias após a administração de antibióticos e pela relutância, por parte dos médicos, em realizar a punção lombar na admissão dos pacientes. De fato, pacientes com meningite freqüentemente recebem antibióticos por via oral ou venosa antes que o diagnóstico seja suspeitado ou estabelecido. Portanto, um método alternativo que seja capaz de auxiliar clínicos e epidemiologistas na conduta e controle da meningite bacteriana se faz necessário. Nós avaliamos o uso da reação da polimerase em cadeia (PCR) para amplificação de um fragmento do gene da pneumolisina (*ply*) para o diagnóstico da meningite causada por *Streptococcus pneumoniae*. A sensibilidade do método da PCR no LCR foi de 96% (intervalo de confiança 95%, 95%IC, 90 – 99%), com especificidade de 100% (95% IC 83-100%). A cultura foi positiva em apenas 59% (95% IC 49-69%) dos casos, enquanto a bacterioscopia e a aglutinação de látex foram positivas em 66% (95% IC 56-74%) e 78% (95% IC 69-86%), respectivamente. O método da PCR fornece resultados 4h após o início do ensaio. Esta abordagem molecular provou ser confiável e útil para o diagnóstico desta bactéria quando comparada com os métodos laboratoriais clássicos para identificação dos agentes causadores de meningite bacteriana.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*; Reação da polimerase em cadeia; Meningite; Pneumolisina; Doenças Infecciosas e Parasitárias

Rio de Janeiro
Dezembro/2007

ABSTRACT

TÍTULO EM INGLÊS

Juliana Arruda de Matos

Orientadores: Prof. Dr. David Eduardo Barroso
Prof^a. Dr^a. Cristina Barroso Hofer

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Diagnosis of bacterial meningitis has long been based on classical methods of Gram stain, serological tests, and culture of cerebrospinal fluid (CSF). The performance of these methods, especially culture and direct smear, is thwarted by failure to detect bacteria following administration of antimicrobial agents and reluctance to perform lumbar punctures at admission. Indeed, patients with meningitis frequently receive antibiotics orally or by injection before the diagnosis is suspected or established. Thus an alternative method has become necessary to help clinicians and epidemiologists to manage and control bacterial meningitis. We evaluated the application of a polymerase chain reaction-based (PCR) assay for amplification of pneumolysin gene (*ply*) to the diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* meningitis. The PCR assay sensitivity for CSF was 96% (95% confidence interval, CI, 90-99%) compared to a sensitivity of 59% for culture (95% CI 49-69%), 66% for Gram stain (95% CI 56-74%), and 78% for latex agglutination test (95% CI 69-86%); PCR specificity was 100% (95% CI 83-100%). PCR results were available within 4 h of the start of the assay. This molecular approach proved to be reliable and useful to identify this bacterium compared with other classical laboratory methods for identification of bacterial meningitis pathogens.

Key-words:

Rio de Janeiro
Dezembro/2007

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES, DE QUADROS E DE TABELAS.....	XI
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1 Meningite bacteriana aguda.....	8
2.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	23
2.2.1 <i>Histórico</i>	23
2.2.2 <i>Classificação</i>	26
2.2.3 <i>Identificação</i>	29
2.2.4 <i>Fatores de virulência</i>	33
2.2.5 <i>Fisiopatogenia</i>	37
2.2.6 <i>Epidemiologia</i>	40
2.2.6.1 Aspectos gerais.....	40
2.2.6.2 Meningite pneumocócica com perfil epidêmico.....	48
2.2.6.3 Resistência aos antimicrobianos.....	51
2.2.6.4 Impacto das vacinas antipneumocócicas.....	62
2.3 A Reação da Polimerase em Cadeia	66
2.4 Validação dos testes diagnósticos	71
3 JUSTIFICATIVA.....	78
4 OBJETIVOS.....	79
4.1 Objetivo geral	79
4.2 Objetivos específicos	79
5 METODOLOGIA	80
5.1 Local, desenho do estudo e definição de caso.....	80
5.2 Espécimes clínicos.....	82
5.3 Ensaio da PCR.....	85
5.4 Rendimento do teste.....	87
5.5 Considerações éticas	88
6 RESULTADOS.....	89
7 DISCUSSÃO	103
8 CONCLUSÕES	127
9 RECOMENDAÇÕES.....	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
ANEXOS.....	148

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	Coleção Estadunidense de Culturas Padrão (do inglês <i>American Type Culture Collection</i>)
BGN	bastonete gram-negativo
BHE	barreira hematoencefálica
BIG	região da Baía de Ilha Grande
BL	região da Baixada Litorânea
Cbp	proteínas que ligam colina (do inglês <i>choline binding protein</i>)
CDC	Centros para Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CID	classificação internacional de doenças
CIM	concentração inibitória mínima
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais dos EUA (do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
DGN	diplococos gram-negativos
DGP	diplococos gram-positivos
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	trifosfato de deoxiribonucleotídeos
DPI	doença pneumocócica invasiva
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
ELISA	ensaio de imuno-adsorbância ligado a enzima (do inglês <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	vírus da imunodeficiência humana (do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>)
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEISS	Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião
IOC	Instituto Oswaldo Cruz

LCR	líquido cefalorraquidiano
MBA	meningite bacteriana aguda
MLST	tipagem por seqüenciamento de múltiplos <i>loci</i> (do inglês <i>multilocus sequence typing</i>)
MP	região do Médio Paraíba
MT1	região Metropolitana I
MT2	região Metropolitana II
NO	região Noroeste
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBP	proteínas que ligam penicilina (do inglês <i>penicillin-binding proteins</i>)
PCR	reação de polimerase em cadeia (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-EIA	reação da polimerase em cadeia com detecção por ensaio imunoenzimático (do inglês <i>polymerase chain reaction–enzyme immunoassay</i>).
PFGE	eletroforese em gel sob campo pulsado (do inglês <i>pulsed field gel electrophoresis</i>)
PMEN	Rede de Epidemiologia Molecular Pneumocócica (do inglês <i>Pneumococcal Molecular Epidemiology Network</i>)
Psp	proteínas de superfície pneumocócicas
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal
RT-PCR	reação da polimerase em cadeia em tempo real
S	região Serrana
SES RJ	Secretaria de Estado da Saúde do Rio de Janeiro
SIH/SUS	Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde
SNC	sistema nervoso central
SSI	Instituto Sorológico Statens (do inglês <i>Statens Serum Institute</i>)
UFC	unidades formadoras de colônia
VCP7	vacina conjugada pneumocócica heptavalente
VCP9	vacina conjugada pneumocócica nonavalente
VCP11	vacina conjugada pneumocócica 11-valente
VCP13	vacina conjugada pneumocócica 13-valente
VPN	valor preditivo negativo
VPP	valor preditivo positivo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, DE QUADROS E DE TABELAS

Figura 1	Esquema das estruturas de revestimento do sistema nervoso central.	9
Figura 2	Distribuição dos 106 espécimes de LCR positivos para <i>S. pneumoniae</i> de acordo com a residência do paciente, segundo o plano diretor de regionalização do Estado do Rio de Janeiro (vide Anexo 2)	91
Figura 3	Amplificação pela PCR do gene <i>ply</i> de uma cepa de referência de <i>Streptococcus pneumoniae</i> e de espécimes de LCR de casos confirmados de meningite pneumocócica. 1: marcador de tamanho de DNA; 2: cepa ATCC 49619; 3: espécime com cultura positiva; 4: espécime com látex positivo; 5: espécime com DGP visualizado à bacterioscopia; 6: controle negativo.....	96
Gráfico 1	Contribuição dos exames de bacterioscopia, cultura, látex e PCR no diagnóstico de meningite pneumocócica em 106 pacientes.	97
Gráfico 2	Localização da residência dos pacientes e serviços onde foram realizadas as coletas de LCR segundo o plano diretor de regionalização do Estado do Rio de Janeiro (vide Anexo 2).	100
Quadro 1	Principais agentes etiológicos das MBA por faixa etária e fatores de risco.....	23
Tabela 1	Relação entre os resultados de um teste e a presença/ausência de doença para determinação de sensibilidade e especificidade de um método diagnóstico.	72
Tabela 2	Espécimes de LCR utilizados para cálculo de especificidade.....	85

Tabela 3	Resultados de cultura, bacterioscopia e látex nos espécimes incluídos e não incluídos no estudo.	90
Tabela 4	Achados dos exames inespecíficos de 106 espécimes de LCR de pacientes com diagnóstico de meningite por <i>S. pneumoniae</i>	93
Tabela 5	Características de 106 espécimes de LCR positivos para <i>S. pneumoniae</i>	94
Tabela 6	Performance da reação da polimerase em cadeia (PCR), da cultura, da bacterioscopia pelo método de Gram e do teste de aglutinação de látex para o diagnóstico de meningite por <i>S. pneumoniae</i> em espécimes de LCR de 106 pacientes infectados.....	95
Tabela 7	Relação entre o uso de antibióticos antes da realização da punção lombar e os resultados dos exames de bacterioscopia, látex, cultura e PCR <i>ply</i> em espécimes de LCR de 106 pacientes com meningite por <i>S. pneumoniae</i>	99
Tabela 8	Resumo com os principais dados de alguns trabalhos publicados sobre uso de técnicas baseadas na PCR para diagnóstico de meningite pneumocócica.....	110

“J’y vois, pour ma part, un symptôme nouveau de grand avenir pour la connaissance étiologique des maladies dont la cause doit être attribuée à la présence et au développement d’organismes microscopiques.”

"Eu vejo nisso, de minha parte, um sintoma novo e promissor para o conhecimento etiológico das doenças cuja causa deve ser atribuída à presença e ao desenvolvimento de organismos microscópicos".

Louis Pasteur, março de 1881, sobre a sua recém descoberta do potencial patogênico em animais do *Microbe septicémique du saliva*, hoje conhecido como *Streptococcus pneumoniae*.

1 INTRODUÇÃO

A meningite bacteriana aguda (MBA) é uma doença de grande importância clínica e epidemiológica em todo o mundo. Pelo menos 1,2 milhões de casos de meningite bacteriana ocorrem a cada ano, dos quais 135.000 resultam em óbito, segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 1998). A susceptibilidade à doença é universal, abrangendo pessoas de qualquer faixa etária e classe social, embora haja maior concentração de casos na infância e nas classes sociais mais desfavorecidas (Nery-Guimaraes *et al.*, 1981; Tunkel, 2005b). A MBA é uma das principais emergências médicas, habitualmente acometendo indivíduos previamente hígidos, com evolução potencialmente fatal (Weisfelt *et al.*, 2006). Estas características, associadas à dificuldade em se obter o diagnóstico rápido e preciso, fazem com que a MBA seja temida tanto por médicos quanto pela população leiga.

As MBA são responsáveis por significativa morbiletalidade no nosso país. Segundo os dados divulgados pelo Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS), foram registradas, no Brasil, 7.265 internações por meningite bacteriana no ano de 2006. O percentual de casos ocorridos em crianças com menos de 5 anos de idade foi de 35,3%. O número total de óbitos foi de 640, com as maiores taxas de letalidade nos extremos etários. O gasto total de tais internações foi de R\$7.098.030,37, com uma média de R\$977,02. A média de permanência de internação foi de 11,2 dias (Fonte: Ministério da Saúde-SIH/SUS).

Embora os principais agentes etiológicos da meningite bacteriana comunitária, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), que respondem por cerca de 90% dos casos confirmados

(WHO, 1998), sejam responsivas à antibioticoterapia, as dificuldades em se obter o diagnóstico preciso e a tempo representam um problema para o tratamento adequado (Ragunathan *et al.*, 2000; Heyderman *et al.*, 2003; Makwana *et al.*, 2004).

Hib, que já foi considerado uma importante etiologia de meningite, é agora um patógeno humano raro onde a vacinação é feita rotineiramente (Tunkel, 2005b). A vacina conjugada contra Hib virtualmente eliminou a meningite provocada por este patógeno nos países industrializados, como os Estados Unidos da América (EUA), onde o número de casos notificados da doença diminuiu de mais de 100.000 para menos de 100 casos por ano (Ribeiro *et al.*, 2007). Analogamente, uma redução do número de casos de doença invasiva por *S. pneumoniae* tem sido registrada em alguns países onde a vacina conjugada é administrada rotineiramente, o que não ocorre no Brasil (Whitney *et al.*, 2003; Messina *et al.*, 2007).

Historicamente, a principal causa de MBA no Brasil é *N. meningitidis*, seguida por Hib e *S. pneumoniae*, geralmente nessa ordem. A partir de 2000, *S. pneumoniae* passou a ser a 2ª maior causa de MBA no nosso país, em virtude da diminuição expressiva da incidência de meningite por Hib, resultante da implementação, a partir de 1999, da vacina conjugada contra Hib para menores de 2 anos no programa nacional de imunização (Miranzi Sde *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007). Em 2002, *N. meningitidis* foi responsável por 3.769 casos notificados no Brasil, o que corresponde a uma taxa de incidência de 2,19 casos por 100.000 habitantes. No mesmo ano, foram notificados no país 1.128 casos de meningite por *S. pneumoniae*, o que equivale a uma taxa de incidência de 0,65 casos por 100.000 habitantes (Fontes: SVS/Ministério da Saúde e IBGE).

S. pneumoniae é a segunda principal causa de MBA no Estado do Rio de Janeiro, e foi responsável por cerca de 154 casos ao ano entre 2001 e 2005 (Fonte:

Assessoria de meningites / Secretaria de Estado da Saúde do Rio de Janeiro - SESRJ). É também a segunda principal etiologia de MBA na cidade do Rio de Janeiro, com cerca de 60 casos anuais notificados no período de 2001 a 2005, o que corresponde a uma taxa de incidência de 1,2 por 100.000 habitantes. A letalidade neste período foi de 37% e o número de sobreviventes que desenvolveram seqüela neurológica é desconhecido (Fonte: GVEVS/COE/SSC/SMS-RJ). Das duas principais causas de MBA, *S. pneumoniae* apresenta a maior taxa de letalidade e uma alta taxa de seqüelas neurológicas permanentes (Crook e Spratt, 1998; Heyderman *et al.*, 2003; Parent du Chatelet *et al.*, 2005).

A definição do agente etiológico das MBA de forma precisa e em tempo hábil é de fundamental importância tanto do ponto de vista clínico quanto epidemiológico. Dependendo da etiologia, o tipo de antibiótico e a duração do tratamento poderão ser alterados, com evidentes benefícios tanto para o paciente quanto para a economia e ecologia hospitalar (Tunkel *et al.*, 2004). Em todo o mundo, a incidência de isolados clínicos de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina vem aumentando, o que representa um grande problema para o tratamento das doenças pneumocócicas, em especial das meningites. Tal resistência geralmente está associada a múltiplas drogas (Crook e Spratt, 1998). No Brasil, os níveis de resistência intermediária (concentração inibitória mínima – CIM 0,12–1µg/ml) à penicilina variam de 17,0% a 27,8% e os de resistência total (CIM \geq 2µg/ml) variam de 4,0 a 11,0%, com importantes diferenças regionais. A resistência a três ou mais drogas foi observada em 4,6% das amostras obtidas de sítios estéreis (Castanheira *et al.*, 2004; Brandileone *et al.*, 2006; Castanheira *et al.*, 2006). Além do aumento da resistência, recentemente foi relatada a emergência de cepas com potencial de causar epidemias de meningite semelhantes às epidemias de *N. meningitidis* na

África Subsaariana, região do Sahel denominada de “cinturão da meningite” (Leimkugel *et al.*, 2005; Parent du Chatelet *et al.*, 2005).

Os métodos clássicos de diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas são a bacterioscopia, a cultura e a pesquisa de antígeno capsular pelo teste do látex. A sensibilidade desses métodos é afetada por uma série de fatores, tais como o uso prévio de antimicrobianos, o retardo na realização da punção lombar e a disponibilidade de laboratório de microbiologia confiável (Bell e McCormick, 1981; Thomson e Bertram, 2001). Essas técnicas dependem de uma estrutura laboratorial relativamente complexa instalada próxima ao local de ocorrência dos casos, já que o processamento do material deve ser feito idealmente nas primeiras 2h após a sua coleta. A positividade das culturas começa a ser fortemente afetada caso o líquido cefalorraquidiano (LCR) não seja semeado em até 15 minutos, devido à diminuição rápida da viabilidade das três principais causas de meningite bacteriana (Thomson, 2003). Tal aspecto torna o diagnóstico etiológico da meningite difícil em áreas remotas ou com poucos recursos.

A conduta médica de se iniciar antibióticos por via parenteral tão logo se suspeite do diagnóstico de MBA é formalmente recomendada, visando à diminuição da chance do paciente vir a falecer pela doença, especialmente quando a punção lombar estiver contra-indicada (Riordan e Cant, 2002; Tunkel *et al.*, 2004). Tal recomendação vem sendo enfatizada aos médicos assistentes e na formação médica desde a década de 1990, como a conduta padrão para pacientes com suspeita clínica tanto de doença meningocócica quanto de MBA (Bell e McCormick, 1981; Cartwright *et al.*, 1992; Heyderman *et al.*, 2003; Makwana *et al.*, 2004). Portanto, uma redução na proporção de casos confirmados pelos métodos bacteriológicos convencionais era esperada, já que muitos pacientes passaram a ser

submetidos à punção lombar já em vigência de antibioticoterapia ou várias horas após o seu início (Dalton e Allison, 1968; Feldman, 1978; Kanegaye *et al.*, 2001; Nigrovic *et al.*, 2004). A sensibilidade da bacterioscopia realizada após o início da antibioticoterapia cai de 75 a 90% para cerca de 40 a 60% (Thomson e Bertram, 2001). Um trabalho retrospectivo mostrou que o crescimento de *S. pneumoniae* na cultura de LCR é inibido a partir de 4h após o início da antibioticoterapia parenteral (Kanegaye *et al.*, 2001). O teste do látex está menos sujeito a interferências pelo uso prévio de antibiótico. No entanto, sua utilidade vem sendo questionada no diagnóstico de pacientes previamente tratados, por não ampliar a sensibilidade obtida pela cultura e bacterioscopia em conjunto (Nigrovic *et al.*, 2004; Tunkel *et al.*, 2004).

A crescente prática de administração precoce de antibióticos parenterais, associada à relutância em realizar a punção lombar na admissão, é apontada como fator crucial na redução do rendimento dos métodos bacteriológicos convencionais e, conseqüentemente, do percentual de casos confirmados, especialmente pela cultura do LCR ou sangue (Cartwright *et al.*, 1992; Ragunathan *et al.*, 2000; Corless *et al.*, 2001; Kanegaye *et al.*, 2001; Riordan e Cant, 2002; Nigrovic *et al.*, 2004). Tal tendência também vem sendo observada na cidade do Rio de Janeiro, onde tem sido registrado um aumento no número de casos de MBA não confirmados por cultura desde meados da década de 1990 (Fonte: GVEVS/COE/SSC/SMS-RJ).

Diante desse panorama, faz-se necessário o uso de técnicas alternativas para o diagnóstico etiológico das MBA. A técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) vem sendo utilizada com sucesso para a confirmação da etiologia de casos de meningite bacteriana não determinada (G00.9, da Classificação Internacional de Doenças - CID-10). Por ser um método

molecular de amplificação do ácido nucléico, apresenta uma inerente maior sensibilidade. É capaz de detectar bactérias tornadas não viáveis por agentes antimicrobianos ou físicos, e permite o diagnóstico a partir de espécimes clínicos com pouco volume ou contendo pequeno número de bactérias (5 a 1000 unidades formadoras de colônia por mililitro - UFC/ml) (Cherian *et al.*, 1998; Backman *et al.*, 1999; van Haeften *et al.*, 2003; Freeman *et al.*, 2004; Schuurman *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2007; Welinder-Olsson *et al.*, 2007). Além disso, os antimicrobianos não atuam como inibidores da reação (Cartwright *et al.*, 1992; Borrow *et al.*, 1997; Raganathan *et al.*, 2000; Rintamaki *et al.*, 2002; Clarke, 2003). Uma vez extraído o DNA genômico, o ensaio da PCR convencional fornece um resultado entre 4 e 5 horas após o início da reação. A conservação dos espécimes por longo período é outro ponto favorável (Backman *et al.*, 1999; Thomson e Bertram, 2001; Sidikou *et al.*, 2003). Os espécimes podem ser mantidos em geladeira (4°C) por várias semanas ou congelados (-20°C) durante anos. Espécimes de sangue total (coletados em frascos contendo EDTA) podem permanecer em temperatura ambiente durante 1 a 5 dias, sem que a sensibilidade seja afetada. O mesmo parece ser verdade para os espécimes de LCR, conforme ficou demonstrado em publicações prévias (Taha *et al.*, 2005).

Na literatura, há inúmeras publicações sobre o uso da técnica da PCR para detecção de *S. pneumoniae* no sangue, aspirado de ouvido médio, líquido pleural e LCR (Saukkoriipi *et al.*, 2002; van Haeften *et al.*, 2003; Le Monnier *et al.*, 2006). Muitas delas utilizam iniciadores (*primers*) que amplificam o gene que codifica a toxina pneumolisina (*ply*) (Virolainen *et al.*, 1994; Salo *et al.*, 1995; Corless *et al.*, 2001; Clarke, 2003; Freeman *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; Mayoral *et al.*, 2005). A pneumolisina é uma toxina protéica espécie-específica produzida intracelularmente

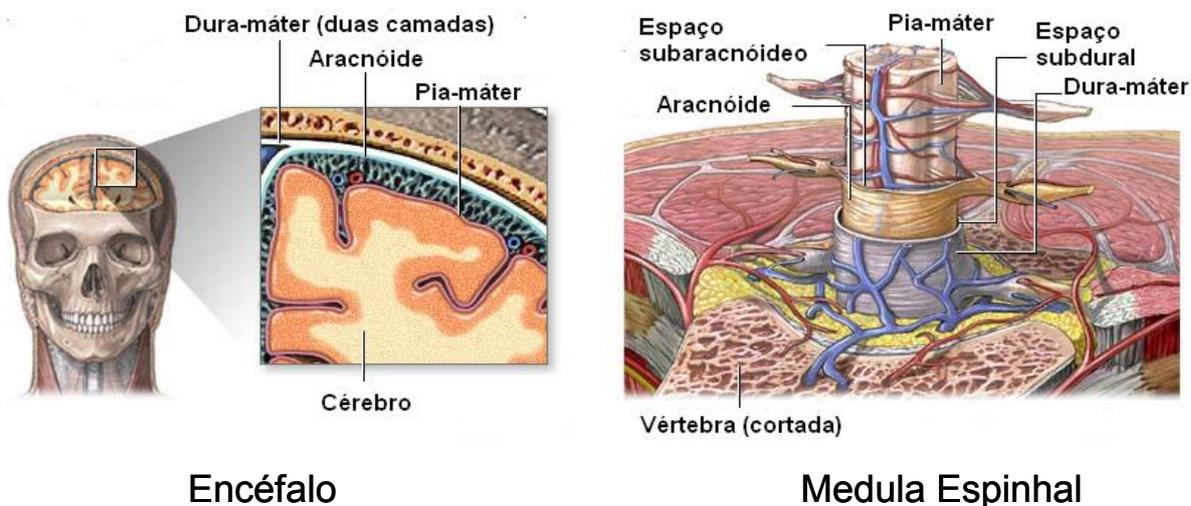
por todas as cepas de *S. pneumoniae* isoladas de espécimes clínicos, independentemente do antígeno capsular polissacarídico (sorotipo) (Walker *et al.*, 1987). Esta citolisina descoberta há 100 anos é considerada um fator de virulência importante nas infecções pneumocócicas invasivas (Libman, 1905; Hirst *et al.*, 2004). Tais características tornam o gene *ply* um atraente alvo para o diagnóstico molecular da doença invasiva provocada por *S. pneumoniae* (Salo *et al.*, 1995).

A introdução do ensaio da PCR na rotina de diagnóstico das meningites bacterianas certamente ampliaria a vigilância desta doença em nossa comunidade. Isto é particularmente importante para aquela causada por *S. pneumoniae*, pois o Ministério da Saúde do Brasil não considera a bacterioscopia isoladamente como critério diagnóstico para a confirmação de caso (Brasil, 2005a). Contudo, o ensaio da PCR para a identificação de *S. pneumoniae* ainda não foi validado como instrumento de diagnóstico em nossa população. Assim, propusemos este estudo para determinar a efetividade de uma técnica da PCR para detecção de *S. pneumoniae* em espécimes de LCR de pacientes com meningite pneumocócica no Estado do Rio de Janeiro, sem que houvesse uma otimização das condições de coleta e transporte, comparando-a com as técnicas padrão de diagnóstico laboratorial.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Meningite bacteriana aguda

As meninges são as membranas que revestem o sistema nervoso central (SNC). Compreendem três camadas: a pia-máter, a mais interna, em íntima relação com o parênquima do cérebro e da medula espinhal, a dura-máter, a mais externa, aderida ao revestimento ósseo, e a aracnóide, entre as duas primeiras. A pia-máter é constituída por tecido conjuntivo delicado, contínuo à bainha de tecido conjuntivo que circunda os vasos sanguíneos do encéfalo e da medula espinhal. Entre a pia-máter e a aracnóide existe um espaço denominado espaço subaracnóideo, por onde circula o LCR. Essa estrutura tem como finalidade a proteção do encéfalo, dificultando o seu choque direto com a face interna da calota craniana em seguida a um trauma (concussão cerebral). O LCR é produzido majoritariamente (85%) nos plexos coróides, localizados no sistema ventricular, sendo o restante produzido por difusão do parênquima através da pia-máter. A absorção se dá através das granulações aracnóides, nos plexos venosos. O volume do LCR é de aproximadamente 140ml, no indivíduo adulto, e é totalmente renovado 3 a 5 vezes ao dia devido à sua contínua produção e absorção (Ross, 1993; Bleck, 2000).



Fonte: adaptado de A.D.A.M. – <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/19088.htm> e <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/19080.htm>

Figura 1 Esquema das estruturas de revestimento do sistema nervoso central.

O LCR é um líquido incolor e transparente, composto por água, eletrólitos (e.g. sódio, potássio, magnésio, cloro, fosfato inorgânico, bicarbonato), oxigênio, açúcares (e.g. glicose, frutose), proteínas (e.g. albumina, globulinas), lactato, aminoácidos, uréia, amônia, creatinina, lipídios, neurotransmissores e seus metabólitos, hormônios (e.g. insulina, gastrina) e vitaminas. O LCR normal, em adultos, não contém hemácias e o número de leucócitos não ultrapassa 5 células/mm³, sendo virtualmente 100% do tipo mononuclear (linfócitos e monócitos) (Nathan, 1999).

Meningite é definida como um processo inflamatório envolvendo as leptomeninges (pia-máter e aracnóide), caracterizado pela migração de células brancas sangüíneas (leucócitos), detectável no exame microscópico do LCR. A pia-máter é bastante eficaz em impedir a propagação do processo infeccioso para o encéfalo. Quando esse processo inflamatório estende-se ao parênquima cerebral e à medula, o quadro é melhor definido pelo termo meningoencefalite (Brasil, 2005b). Alternativamente, o processo infeccioso pode acometer apenas o cérebro, na

ausência de resposta inflamatória no espaço subaracnóideo, sendo caracterizado por alteração do nível de consciência e, neste caso, denominado encefalite.

As meningites podem ser causadas por diferentes agentes infecciosos (vírus, bactérias, fungos, helmintos e protozoários) e não infecciosos (neoplasias, drogas, doenças inflamatórias e granulomatosas). Podem ser classificadas quanto ao tempo de evolução ou ao tipo de expressão inflamatória observada no LCR. Quanto ao tempo de evolução, são classificadas como aguda, quando o quadro se instala em horas a menos de 7 dias, subaguda ou crônica (mais de 3 semanas). Quanto ao tipo de expressão inflamatória, as meningites são divididas em linfomonocitárias e neutrofílicas ou purulentas. As meningites bacterianas são na sua maioria de evolução aguda e com padrão neutrofílico (Brasil, 2005b; Tunkel, 2005b).

Meningite supurativa aguda é a apresentação mais freqüente de infecção bacteriana do SNC. Na maioria dos casos, a invasão das meninges ocorre como consequência da invasão primária da corrente sanguínea. Para que haja o desenvolvimento de meningite a bactéria deve atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), que tem a função de manter a homeostasia do SNC. As bactérias ganham o SNC seguindo uma interação direta com o lúmen do endotélio cerebral, que constitui a BHE. O número limitado de patógenos capazes de invadir as meninges sugere que possuam atributos específicos, como a afinidade por moléculas de adesão do endotélio cerebral (Leib e Tauber, 1999; Brasil, 2005b).

O quadro clínico clássico da MBA ou meningite supurativa (G00.9, CID-10) é caracterizado por cefaléia, febre, vômitos e sinais de irritação meníngea, embora nem sempre todos os sinais e sintomas estejam presentes num dado paciente, particularmente nos extremos da vida. Variados graus de alteração de nível de consciência são notados (meningoencefalite bacteriana - NCOP G04.2), guardando

relação direta com a gravidade do acometimento encefálico. Nos neonatos e lactentes, o quadro clínico é mais inespecífico, sendo caracterizado por recusa alimentar, hipertermia ou hipotermia, apatia, irritabilidade alternada com sonolência, choro à mobilização da cabeça, convulsão, alteração do nível de consciência, abaulamento da fontanela e vômitos. Nos idosos, o único sintoma pode ser a diminuição do nível de consciência. A dificuldade de diagnóstico precoce nos idosos pode ser agravada pela existência de doença de base, cujos sintomas de descompensação podem se confundir com aqueles da meningite. Nos lactentes, o retardo no diagnóstico pode ser decorrente da presença de sintomas comuns aos quadros de infecção do trato respiratório ou gastroenterite. Com a progressão do quadro, o paciente evolui para o coma, eventualmente crises convulsivas e sinais de hipertensão intracraniana grave. O óbito é o desfecho inexorável em virtualmente 100% dos casos não tratados e em cerca de 5 a 10% daqueles adequadamente diagnosticados e tratados, porém estes percentuais variam de acordo com a etiologia. São fatores associados a pior prognóstico: idade maior que 60 anos, alteração do nível de consciência, ocorrência de crise convulsiva e hipotensão arterial (Aronin *et al.*, 1998; Nogueira, 1998; Miner *et al.*, 2001; Tavares, 2001; Brasil, 2005b; Tunkel, 2005b; Winn Jr., 2006).

O diagnóstico de meningite é baseado numa suspeita clínica, porém o diagnóstico definitivo é estabelecido pelos achados dos exames inespecíficos e específicos do LCR. Na avaliação das infecções do SNC, através da análise do LCR obtido pela punção lombar, vários parâmetros devem ser observados. A pressão de abertura é medida assim que a agulha de punção lombar atinge o espaço subaracnóideo, e seu valor normal se situa entre 50 e 195 mmH₂O. Na MBA esses valores costumam variar entre 200 e 500 mmH₂O. O aspecto do LCR normalmente é

transparente e incolor (“água de rocha”), porém na MBA geralmente torna-se turvo ou purulento, como consequência do aumento do conteúdo de células do tipo polimorfomonuclear e do nível de proteínas, assim como pela presença de bactérias. A alteração do aspecto do LCR, através da inspeção visual, começa a ser notada quando a celularidade global ultrapassa 200 céls/mm^3 , enquanto a turbidez provocada pela presença de bactérias é perceptível a partir de 10^5 UFC/ml (Tunkel, 2005a). Os exames inespecíficos realizados rotineiramente na maioria dos laboratórios de análise clínica para avaliação do LCR são a celularidade global e específica e a mensuração dos níveis de proteína e glicose. Os valores considerados normais no LCR de crianças maiores de 3 meses e adultos são: celularidade global - 0 a 5 leucócitos/ mm^3 ; celularidade específica – 100% linfomononucleares; glicose – $> 0,6 \text{ X glicemia}$; proteína - $<50\text{mg/dl}$. Na MBA são observados tipicamente pleocitose neutrofilica (1.000 a 5.000 leucócitos, na maioria dos casos, podendo variar de <100 a >10.000 , dos quais mais de 50% são do tipo polimorfomonuclear), hipoglicorraquia ($<0,4 \text{ X glicemia}$) e hiperproteínorraquia (geralmente $> 100 \text{ mg/dl}$) (Nathan, 1999; Tunkel, 2005a). Cerca de 5 a 10% dos pacientes com MBA apresentam contagem de leucócitos no LCR normal ou apenas discretamente aumentada. A contagem de leucócitos inferior a $1.000 \text{ células/mm}^3$ é um fator de risco independente para um pior prognóstico nos pacientes com MBA, incluindo aqueles com meningite pneumocócica (van de Beek *et al.*, 2004; Tunkel, 2005a; Weisfelt *et al.*, 2006). Devido à hipotonicidade do LCR, que provoca lise celular, a contagem de leucócitos, especialmente os do tipo neutrófilos, pode ficar prejudicada pela demora no processamento laboratorial do espécime clínico. O número de neutrófilos sofre um decréscimo de 32% após uma hora, e de 50% após duas horas, em espécimes de LCR mantidos em temperatura ambiente (Steele *et*

al., 1986).

Outros exames inespecíficos que podem ser úteis na avaliação dos pacientes com suspeita de MBA são a dosagem do lactato, cloretos, proteína C reativa e a procalcitonina. O lactato no LCR maior que 4,2 mmol/L tem uma sensibilidade de 96% para diagnóstico de MBA, e é capaz de diferenciar de forma segura as meningites purulentas das não purulentas. Por continuar alterado por um tempo maior do que a glicose após o início de terapia adequada, esse exame é útil para o diagnóstico tardio de MBA. No entanto, a dosagem de lactato pode estar alterada também nas hemorragias cerebrais, na hipertensão maligna, na encefalopatia hepática, no *diabetes mellitus* e no coma hiperosmolar. Já a concentração de cloretos no LCR está relacionada com a osmolaridade do meio extracelular e a alterações no equilíbrio ácido-básico. Não tem valor diagnóstico nas MBA, porém diminui de forma marcante em processos crônicos como na meningite tuberculosa (Focaccia, 1996; Nathan, 1999). A proteína C reativa é um reagente de fase aguda que pode ser medido no sangue e no LCR e tem sido proposto como uma ferramenta auxiliar na diferenciação entre meningite bacteriana e viral. Um estudo que avaliou a dosagem sérica da proteína C reativa no diagnóstico de MBA de pacientes com bacterioscopia do LCR negativa, o exame apresentou uma sensibilidade de 96%, especificidade de 93% e um valor preditivo negativo (VPN) de 99%. Portanto, esse teste pode ser útil nos casos com LCR alterado porém com bacterioscopia negativa e o médico está considerando adiar o início da antibioticoterapia pela hipótese de meningite viral (Tunkel *et al.*, 2004). A procalcitonina, um precursor da calcitonina, é um marcador de sepse bacteriana, e altas concentrações correlacionam-se com a gravidade do quadro clínico. A procalcitonina plasmática tem sido proposta como um marcador diagnóstico na

diferenciação das meningites, com uma sensibilidade e especificidade de prognosticar uma etiologia bacteriana superiores às da proteína C reativa e da contagem de células brancas no sangue (Carrol *et al.*, 2002).

Os exames mais utilizados na prática clínica para o diagnóstico etiológico das meningites bacterianas agudas são a bacterioscopia, a pesquisa de antígeno pelo teste de aglutinação do látex e a cultura. O exame direto do LCR com o intuito de visualizar o agente etiológico das MBA pode ser feito através da coloração com azul de metileno e pela coloração pelo método de Gram. O exame direto após coloração com azul de metileno apresenta maior sensibilidade, porém não distingue a bactéria quanto à sua característica tintorial (Gram positivo ou negativo), devendo, portanto, ser uma abordagem complementar à bacterioscopia pelo Gram (Winn Jr., 2006). Na literatura, a sensibilidade da bacterioscopia pelo método de Gram varia entre 75 e 90%, e a especificidade varia entre 97 e 100%, na ausência de antibioticoterapia prévia. Após o início da antibioticoterapia, no entanto, a sensibilidade do método cai para 40 a 60%. Este exame tem a vantagem de ser rápido e barato, porém é menos sensível do que os outros métodos. Além disso, a bacterioscopia é observador-dependente, estando sujeita a erros de execução e interpretação, especialmente se realizada por examinadores menos experientes ou por técnicos generalistas responsáveis por todos os exames laboratoriais solicitados durante plantões noturnos (Thomson e Bertram, 2001). O uso da centrifugação aumenta a chance de visualizar o agente na bacterioscopia em até 100 vezes. Além da experiência do técnico que executa e interpreta o exame, o rendimento da bacterioscopia está relacionado também à concentração do microrganismo no LCR. Quando a concentração bacteriana é menor ou igual a 1.000 UFC/ml, a chance da bacterioscopia do sedimento ser positiva pelo Gram combinado com azul de

metileno é de cerca de 25%; com concentrações entre 1.000 e 100.000 UFC/ml, a bacterioscopia costuma ser positiva em 60% dos casos; se esta concentração for maior ou igual a 100.000 UFC/ml, a positividade sobe para 97% (La Scolea e Dryja, 1984). A sensibilidade do Gram pode depender também do microorganismo, sendo maior para *S. pneumoniae* e *H. influenzae* e menor para *N. meningitidis*, bastonetes gram-negativos (BGN) e *Listeria monocytogenes* (Gray e Fedorko, 1992). O exame direto após coloração com alaranjado de acridina é mais sensível que a bacterioscopia pelo método de Gram, podendo detectar bactérias a partir de 1.000 UFC/ml. Este exame apresenta como vantagens maior sensibilidade em pacientes submetidos a antibioticoterapia prévia, menor tempo necessário para a inspeção da lâmina e a possibilidade de realização da coloração de Gram no mesmo esfregaço, sem que seja preciso descorar a lâmina. A desvantagem é a necessidade de se usar um microscópio de fluorescência (Gray e Fedorko, 1992).

O teste de aglutinação de partículas látex sensibilizadas com anticorpos específicos permite a detecção de antígenos capsulares no LCR, sangue, soro e urina. Apresenta como vantagens ser rápido e de fácil execução, não exigir equipamento especial, além de poder ser usado em outros fluidos que não o LCR e estar menos sujeito a interferências pelo uso prévio de antibiótico do que a bacterioscopia e a cultura. A detecção de antígenos de *S. pneumoniae*, Hib e *N. meningitidis* no LCR e soro pelas técnicas de látex e coaglutinação já foi documentada até 10 dias após o início do tratamento (Gray e Fedorko, 1992). Um inconveniente deste exame, no entanto, é o seu alto custo. A sensibilidade do teste de látex, na literatura, é de cerca de 70%, variando entre 59% e 100%. Já a especificidade do teste é de aproximadamente 99%, variando de 96 a 100% (Gray e Fedorko, 1992; Hayden e Frenkel, 2000; Nigrovic *et al.*, 2004). Resultados falso-

positivos podem surgir devido à reação cruzada com fator reumatóide, sangue, hemácias hemolisadas, altas concentrações de proteína e outros agentes infecciosos, incluindo antígenos vacinais, e são mais comuns quando o teste é realizado em outros fluidos que não o LCR (Gray e Fedorko, 1992; Perkins *et al.*, 1995; Brasil, 2005a; Tunkel, 2005b). Uma estratégia recomendada para diminuir a chance de reação cruzada com outros antígenos é a fervura do material por 5 a 15 minutos. Esse artifício pode também aumentar a sensibilidade do exame (exceto no caso de doença por *N. meningitidis*, cujos antígenos são termolábeis), por liberar antígenos presos a proteínas, especialmente quando o teste é realizado no soro (Gray e Fedorko, 1992). A utilidade clínica do teste de látex, no entanto, vem sendo posta em xeque na literatura. Hayden e cols. (2000) avaliaram os resultados de testes de látex realizados em 344 espécimes de LCR, confrontando-os com resultados de cultura (padrão ouro) e dados de evolução clínica. Nesse estudo, a sensibilidade do teste foi calculada em 70% e a especificidade em 99,4%. Nos sete pacientes corretamente diagnosticados pelo látex, o resultado não alterou a conduta terapêutica; dos dois casos de resultado falso positivo, um paciente recebeu um curso de 7 dias de antibiótico desnecessariamente. Os três pacientes cujos testes de látex foram equivocadamente negativos foram adequadamente tratados com base nos dados clínicos e resultado de Gram. Os autores concluíram que a realização de tal exame deveria ser seriamente questionada (Hayden e Frenkel, 2000). Tarafdar e cols. (2001) chamam a atenção para o fato que os valores de sensibilidade do látex descritos na literatura foram calculados exclusivamente em pacientes com cultura ou bacterioscopia positiva. Num estudo que analisou a sensibilidade do teste de látex em pacientes com critérios clínicos e laboratoriais de meningite bacteriana, a sensibilidade do látex entre os pacientes com cultura positiva foi de 100%, enquanto

a sensibilidade entre os pacientes com cultura e bacterioscopia negativas foi de apenas 7% (Tarafdar *et al.*, 2001) A Sociedade Estadunidense de Doenças Infecciosas (IDSA, do inglês *Infectious Diseases Society of America*), nas suas diretrizes para diagnóstico e tratamento das meningites bacterianas, não recomenda o uso rotineiro do teste de látex para determinação da etiologia bacteriana das meningites, embora reconheça que tal exame possa ser útil nos casos em que o Gram e a cultura tenham sido negativos ou nos casos previamente tratados (Tunkel *et al.*, 2004). Perkins e cols. (1995), entretanto, num estudo que avaliou exames realizados em 478 espécimes de LCR, não encontraram vantagens do látex sobre o Gram no diagnóstico de MBA. Nesse estudo, 2 dos 7 (29%) resultados positivos foram considerados falso positivos, com base em resultados de cultura e evolução clínica dos pacientes (Perkins *et al.*, 1995). Do mesmo modo, no estudo de Nigrovic e cols. (2004) o teste do látex não demonstrou o agente em nenhum dos pacientes com diagnóstico presuntivo de MBA parcialmente tratada, não sendo capaz de acrescentar informações clinicamente úteis àquelas fornecidas pelos resultados do Gram ou cultura. Os autores concluem que tal exame não deve ser solicitado para pacientes com suspeita de MBA cujo LCR foi coletado em vigência de antibioticoterapia (Nigrovic *et al.*, 2004).

Os testes rápidos baseados em imunocromatografia vem sendo desenvolvidos para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas (Iqbal *et al.*, 1999; Tsuda *et al.*, 2007). Tal método consiste num dispositivo portátil contendo uma membrana de celulose onde são adsorvidos anticorpos monoclonais, conjugados a partículas reveladoras, para captura de antígenos. Esta técnica apresenta como vantagens a portabilidade, facilidade de execução e rapidez (resultados em 15 minutos) (Murdoch *et al.*, 2001; Chanteau *et al.*, 2007). Testes rápidos visando a

detecção de antígenos solúveis de *S. pneumoniae* na urina apresentam uma sensibilidade de 50 a 80% e especificidade maior que 90% no diagnóstico de pneumonia pneumocócica em adultos (Murdoch *et al.*, 2001; Mandell *et al.*, 2007). Este exame, contudo, não tem utilidade no diagnóstico de meningite pneumocócica, quando realizado com espécimes de urina, devido à baixa sensibilidade (57,1%) (Samra *et al.*, 2003). No entanto, diversos estudos tem sido realizados visando à padronização do método para o diagnóstico de meningite pneumocócica utilizando espécimes de LCR, com excelentes sensibilidade (95,4 a 100%) e especificidade (100%) (Samra *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2005). Resultados semelhantes têm sido reportados com um teste baseado no mesmo princípio visando o diagnóstico de *N. meningitidis* no LCR, o que faz desta técnica uma ferramenta promissora para o diagnóstico rápido e acurado das MBA em áreas com poucos recursos laboratoriais (Chanteau *et al.*, 2007).

A cultura é considerada o padrão ouro no diagnóstico das meningites bacterianas (Winn Jr., 2006). Para o diagnóstico das MBA por cultura, o LCR deve ser enviado ao laboratório em temperatura ambiente imediatamente após a realização da punção lombar. O exame apresenta um melhor rendimento quando o LCR é semeado em agar chocolate, idealmente, nos primeiros 15 minutos após a coleta, com um intervalo máximo de 2h. Tal recomendação se justifica pela diminuição rápida da viabilidade das três principais causas de meningite bacteriana em espécimes clínicos, em virtude de autólise ou, simplesmente, da incapacidade de sobreviver fora do habitat natural. A necessidade do uso de agar chocolate se deve à possibilidade de isolamento de *H. influenzae*, o qual exige a presença de dois suplementos conhecidos como fatores V (NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo - ou NADP - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e X (Heme, $C_{34}H_{32}N_4O_4Fe$)

para o crescimento em meio de cultura. O material semeado deve ser incubado numa temperatura entre 35 e 37°C, e em atmosfera contendo 3 a 5% de CO₂ e umidade em torno de 50%. Uma concentração de 3% de CO₂ pode ser obtida pelo uso de uma vela acesa dentro do recipiente vedado (Gray e Fedorko, 1992; Winn Jr., 2006). Alguns laboratórios usam meios líquidos; contudo, tais meios permitem o crescimento de bactérias contaminantes com maior freqüência, não sendo indicados de rotina no diagnóstico de MBA comunitária. Seu uso, no entanto, está indicado no diagnóstico de infecções associadas às derivações de LCR, por aumentar a detecção do agente etiológico em 25%. Portanto, o LCR coletado de reservatório ou de equipos de derivações ventriculares deve ser cultivado em meio líquido, além do meio convencional, ao contrário do LCR obtido através de punção lombar (Dunbar *et al.*, 1998; Thomson e Bertram, 2001). A concentração das bactérias presentes no LCR através da centrifugação ou do uso de filtros aumenta o rendimento da técnica de cultura, já que o número de bactérias presentes no LCR de pacientes com meningite pode ser tão baixo quanto 10 UFC/ml (Gray e Fedorko, 1992). Um estudo *in vitro* mostrou que, após a suspensão de uma quantidade conhecida de *S. pneumoniae* em espécimes de LCR previamente estéril, as bactérias foram completamente recuperadas após a centrifugação a 500 x g por 15 min, independente da presença de leucócitos no espécime (Murray e Hampton, 1980). A sensibilidade da cultura relatada na literatura é de 70 a 85%, com especificidade de 100%. O exame, no entanto, é afetado por uma série de fatores como uso prévio de antibióticos, condições inadequadas de armazenamento (amostras refrigeradas ou congeladas), transporte (tempo entre coleta e semeadura maior que 2h) e qualidade do meio de cultura (Tunkel *et al.*, 2004). Kanegaye e cols. (2001), ao analisar retrospectivamente 94 crianças com MBA submetidas à punção lombar após início

da antibioticoterapia, demonstraram que o crescimento de *N. meningitidis* começa a ser afetado após 15 minutos do início do tratamento, sendo seu crescimento completamente inibido após 2h. O crescimento de *S. pneumoniae* começa a ser afetado após 4h de terapia, enquanto o de *Streptococcus agalactiae* só foi afetado após 8h de tratamento (Kanegaye *et al.*, 2001).

A contra-imunoeletroforese cruzada já foi utilizada no passado para o diagnóstico de MBA, com uma sensibilidade entre 70 e 90% e uma especificidade de 98%, com grande variação dos valores de eficiência em relação ao agente pesquisado. No entanto, esse método está em desuso devido à baixa sensibilidade para detectar *N. meningitidis*, ao alto custo e ao longo tempo de execução, sendo racionalmente substituído pela aglutinação de partículas de látex. Outros exames utilizados para detecção de antígenos bacterianos, como o ensaio de imunoadsorância ligado a enzima (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*), o radio-imunoensaio e a imunofluorescência, são descritos como válidos para o diagnóstico das MBA, porém não apresentam utilidade prática na atualidade (Perkins *et al.*, 1995; Focaccia, 1996; Brasil, 2005a).

A coleta de sangue para realização de hemocultura é recomendada em todos os casos de suspeita de meningite bacteriana (Tunkel *et al.*, 2004). O crescimento de bactérias usualmente causadoras de MBA, associado a um quadro clínico compatível, é critério de confirmação do diagnóstico de MBA (WHO, 2003; Brasil, 2005a). Apresenta como vantagem a maior facilidade de obtenção do espécime, o que usualmente permite sua realização antes do início da antibioticoterapia. Essa característica é especialmente útil naqueles casos em que a punção lombar não pode ser realizada imediatamente. Todavia, o rendimento da hemocultura é inferior quando comparado com o cultivo do LCR, principalmente

após a administração da primeira dose de antibióticos. Num estudo realizado no Reino Unido, a hemocultura foi positiva em 22% dos pacientes com diagnóstico clínico de meningite meningocócica (Ragunathan *et al.*, 2000).

Métodos de biologia molecular baseados na amplificação de ácidos nucléicos vêm sendo empregados no diagnóstico das meningites bacterianas em laboratórios de saúde pública da Europa e da África. Desde a década de 1990, vários estudos vêm demonstrando que a técnica da PCR pode ampliar a vigilância epidemiológica das meningites bacterianas, devido à maior sensibilidade e especificidade na detecção de agentes bacterianos no LCR, especialmente após o uso de antibióticos ou na postergação da realização da punção lombar. É o caso dos ensaios da PCR que utilizam iniciadores universais para a amplificação de genes bacterianos. Estes ensaios são capazes de excluir, de forma bastante eficaz, a etiologia bacteriana, já que os valores preditivos negativos reportados variam entre 98 e 100% (Saravolatz *et al.*, 2003; Schuurman *et al.*, 2004). Após a amplificação do gene universal, podem ser utilizadas ainda técnicas de tipagem molecular (*e.g.* digestão por enzimas de restrição, seqüenciamento) para definição do agente etiológico. A sensibilidade desses ensaios varia entre 59 e 86% (Schuurman *et al.*, 2004; Welinder-Olsson *et al.*, 2007). Ensaio específicos para o diagnóstico do agente etiológico também já foram desenvolvidos, como, por exemplo, para *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* e *H. influenzae*, com sensibilidade variando entre 79 e 100% e especificidade entre 91 e 100% (Ragunathan *et al.*, 2000; Bryant *et al.*, 2004; Parent du Chatelet *et al.*, 2005; Rebelo *et al.*, 2006). Outros estudos utilizam a técnica multiplex, através da qual é feita a pesquisa simultânea, através de pares de iniciadores específicos, dos agentes mais frequentemente envolvidos na etiologia das MBA. Ensaio da PCR multiplex para pesquisa de *S. pneumoniae*, *N.*

meningitidis e *H. influenzae* apresentam sensibilidade variando entre 88 e 94%, com especificidade de 96 a 100% (Radstrom *et al.*, 1994; Corless *et al.*, 2001; Tzanakaki *et al.*, 2005). Na república Tcheca e em parte do Reino Unido (Inglaterra e País de Gales), a PCR vem sendo utilizada para confirmação laboratorial e vigilância epidemiológica da meningite e/ou septicemia por *N. meningitidis* desde 2001 e 1996, respectivamente. Em 2003, na República Tcheca, o ensaio da PCR foi responsável por confirmar a etiologia de 17,8% dos casos suspeitos de doença meningocócica, nos quais os demais métodos foram negativos, enquanto no Reino Unido, em 1997, a PCR foi o único teste positivo em 46,6% dos pacientes com diagnóstico clínico desta patologia (Ragunathan *et al.*, 2000; Bronska *et al.*, 2006). No entanto, tais exames ainda não foram incorporados à rotina dos laboratórios de análise clínica em nosso país (Rebelo *et al.*, 2006; Pedro *et al.*, 2007).

As bactérias envolvidas na etiologia das MBA variam de acordo com o grupo etário e os fatores de risco. As MBA dos neonatos (até 28 dias de vida) geralmente resultam de infecções adquiridas da mãe *in utero* ou durante a passagem pelo canal do parto. Outro mecanismo relatado é a transmissão horizontal através das mãos dos profissionais de saúde (Brasil, 2005b; Tunkel, 2005b; Winn Jr., 2006). As bactérias usualmente responsáveis pelas MBA nas diferentes faixas etárias e em certos grupos de risco estão resumidas no quadro 1.

Fator predisponente	Patógenos bacterianos
Idade	
Menos de 28 dias	<i>S. agalactiae</i> , <i>Escherichia coli</i> , outras enterobactérias e <i>L. monocytogenes</i>
De 1 a 3 meses	<i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i> , outras enterobactérias, <i>L. monocytogenes</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> e <i>H. influenzae</i>
De 3 meses a 5 anos	<i>N. meningitidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> e <i>H. influenzae</i>
De 6 a 50 anos	<i>N. meningitidis</i> e <i>S. pneumoniae</i>
Mais de 50 anos	<i>N. meningitidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , bastonetes gram-negativos (BGN) aeróbios e <i>L. monocytogenes</i>
Imunossupressão	<i>N. meningitidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , BGN aeróbios (incluindo <i>P. aeruginosa</i>) e <i>L. monocytogenes</i>
Fratura de base de crânio	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> e <i>S. pyogenes</i>
Traumatismo crânio-encefálico e neurocirurgia	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e BGN aeróbios (incluindo <i>P. aeruginosa</i>)

Fonte: (Brasil, 2005b; Tunkel, 2005b; Winn Jr., 2006)

Quadro 1 Principais agentes etiológicos das MBA por faixa etária e fatores de risco.

2.2 *Streptococcus pneumoniae*

2.2.1 Histórico

Streptococcus pneumoniae foi visualizado, ou ao menos descrito, pela primeira vez em 1875 por Klebs, ao observar o fluido dos pulmões de um homem com pneumonia. Em 1880 o agente foi novamente descrito por Eberth, que o

vislumbrou ao examinar os exsudatos do pulmão hepatizado e do espaço subaracnóide de um homem com pneumonia e meningite secundária. No mesmo ano, Mátray descreveu e denominou *Pneumoniekokken* os cocos que observou tanto no escarro de pacientes com pneumonia quanto no de pessoas saudáveis. No entanto, o mérito da descoberta de *S. pneumoniae* coube a Pasteur e Sternberg, que em 1881, de forma independente, isolaram o agente através da cultura em animais. Pasteur, na França, após inocular coelhos com a saliva de uma criança com raiva, isolou o agente em grande quantidade no sangue dos animais, que foram a óbito. O pesquisador denominou o agente *Microbe septicémique du saliva*. Sternberg, nos EUA, também isolou o agente em coelhos, após inoculá-los com a própria saliva. Em 1885 este autor denominou o agente de *Micrococcus pasteurii*, em homenagem ao cientista francês (White, 1938; Finland, 1982). No entanto, a associação entre o agente e a pneumonia lobar só foi efetivamente estabelecida em 1883, tanto por Talamon, que o denominou *Coccus lancéolé de la pneumonie*, quanto por Friedlander, que o denominou *Pneumoniemikrokokken*. Estes autores conseguiram reproduzir a doença pulmonar em animais após a inoculação da bactéria, obtida através da cultura de espécimes clínicos de pacientes com pneumonia (White, 1938; CDC, 2007).

A pneumonia pneumocócica, no entanto, foi confundida com outras formas de pneumonia, especialmente a causada por *Klebsiella pneumoniae*, até 1884, quando foi criada a coloração de Gram (Finland, 1982). Ao final da década de 1880 o agente já era reconhecido como a principal causa de pneumonia lobar, e o termo pneumococo passou a ser utilizado. Em 1926 o gênero foi batizado de *Diplococcus*, devido ao aspecto da bactéria no escarro quando corada pelo método de Gram. Em 1974 o agente foi finalmente denominado *S. pneumoniae*, devido à sua morfologia

quando cultivado em meio líquido (Musher, 2005).

Na virada do século XIX para o século XX, Neufeld descreveu a solubilidade de *S. pneumoniae* em sais biliares, o que se tornou uma ferramenta útil na diferenciação entre o agente e os demais estreptococos. Este mesmo autor demonstrou o desenvolvimento de resposta humoral específica após a infecção ou vacinação por uma determinada cepa de *S. pneumoniae*, o que protegia os animais contra uma nova infecção pelo mesmo organismo. Neufeld descreveu ainda, em 1902, a aglutinação específica e a reação de Quellung, utilizando soros homólogos contra cepas de *S. pneumoniae*. Através da reação de aglutinação, Lister, em 1913, na África do Sul, e Dochez e Gillespie, nos EUA, começaram a dividir o pneumococo em tipos específicos. Nas duas primeiras décadas do século XX, uma mistura de vários tipos de pneumococos íntegros e inativados foi utilizada para vacinação de mineradores de ouro e diamante na África do Sul, com resultados parcialmente eficazes neste grupo altamente susceptível à pneumonia pneumocócica. Em 1920, Heidelberger e Avery demonstraram que os anticorpos que conferiam proteção contra o pneumococo reagiam com polissacarídeos capsulares do agente. Adicionalmente, foi desenvolvido o uso da aglutinação para determinação do sorotipo causador da doença em determinado paciente, assim como antisoros específicos para o tratamento. A partir de 1931 o teste de Quellung passou a ser usado para a sorotipagem rápida do pneumococo, em substituição à aglutinação, e em 1932 já eram conhecidos cerca de 30 dos 90 sorotipos de *S. pneumoniae* hoje reconhecidos (Finland, 1982; Musher, 2005). Felton (1930) preparou pela primeira vez polissacarídeos capsulares purificados com o intuito de imunizar humanos, e em 1938 o polissacarídeo purificado do tipo I foi utilizado para abortar uma epidemia de pneumonia num hospital em Massachusetts, EUA (Musher, 2005). Quando ficou

demonstrado que 80% das infecções pneumocócicas invasivas eram provocadas por 14 sorotipos de *S. pneumoniae* (1, 2, 3, 4, 6A, 8, 9N, 12F, 23F, 25, 7F e 18C), uma vacina contendo polissacarídeos desses 14 sorotipos se tornou disponível, sendo licenciada nos EUA em 1977. Já a vacina polissacarídica 23-valente e a vacina conjugada pneumocócica heptavalente (VCP7) foram licenciadas naquele país em 1983 e em 2000, respectivamente (CDC, 2007).

O primeiro antimicrobiano estudado para tratamento de pneumonia foi a optoquina. Em 1917, no entanto, já havia relatos de resistência a esta droga, que posteriormente foi abandonada para fins terapêuticos, em virtude da sua toxicidade (Klugman, 1990). Em 1938 foi relatada a primeira falha com o uso de sulfonamídicos para tratamento de uma pneumonia, sendo então a resistência do pneumococo ao quimioterápico aventada como uma possível explicação para o fato (Finland, 1982). O advento da penicilina, utilizada na prática clínica a partir de 1943, mudou a história natural da doença pneumocócica. No entanto, a resistência a essa droga passou a ser relatada na literatura a partir de 1967, constituindo-se, especialmente a partir dos anos 90, em grave problema de saúde pública (Crook e Spratt, 1998; Tavares, 2001; Low, 2005).

2.2.2 Classificação

Streptococcus, *Enterococcus* e *Streptococcus*-símile são bactérias gram-positivas, catalase negativas, que tendem a crescer aos pares ou em cadeia. O teste da catalase distingue os membros deste grupo de outros grupos de cocos gram-positivos, como *Micrococcus* e *Staphylococcus*, que são catalase positivos. A taxonomia desse grupo de bactérias é complexa e alvo de freqüentes revisões. A

aplicação de métodos taxonômicos moleculares, como a hibridização DNA-DNA, hibridização do DNA-RNA ribossomal (rRNA) e sequenciamento da fração 16S do rRNA, resultou na descrição de novos gêneros de cocos gram-positivos catalase negativos e numa completa reorganização da taxonomia destes organismos. A próxima edição do Manual Bergey de Sistemática bacteriana deverá trazer profundas modificações em relação à última edição, de 1984. Os cocos gram-positivos, catalase negativos, de origem humana serão classificados dentro de 6 famílias na ordem proposta "Lactobacillales" e em uma família na ordem Bacillales. O gênero *Streptococcus*, que contém os patógenos humanos mais importantes do grupo, será classificado como pertencente ao domínio Bacteria, filo Firmicutes, classe "Bacilli", ordem "Lactobacillales", família Streptococcaceae. Este gênero é ainda dividido em 7 grupos: Piogênico, Sanguis, Mitis, Mutans, Salivarius, Anginosus e Bovis (Winn Jr., 2006).

Streptococcus inclui microorganismos anaeróbios facultativos, embora algumas amostras cresçam melhor em anaerobiose. A maioria das espécies cresce em ar ambiente, porém seu crescimento é estimulado por uma concentração maior de CO₂. Os estreptococos são homofermentativos, ou seja, o produto da fermentação da glicose é apenas o ácido láctico, não havendo produção de gás. São catalase e oxidase negativos, e replicam em cadeia quando cultivados em meio líquido (Winn Jr., 2006). São bactérias fastidiosas, que crescem melhor em meios enriquecidos com sangue ou soro. Tradicionalmente são classificados quanto ao padrão de hemólise em α -hemolíticos, β -hemolíticos e γ -hemolíticos, quando cultivados em meios contendo sangue de carneiro desfibrinado (agar sangue). As bactérias β -hemolíticas são capazes de provocar a lise das hemácias do meio, produzindo um halo transparente ao redor da colônia. Já estreptococos α -

hemolíticos são capazes de reduzir a hemoglobina a um pigmento esverdeado. O termo α -hemólise, apesar de consagrado na literatura, é incorreto, pois independe da presença de hemácias íntegras, podendo ser observado, por exemplo, em colônias cultivadas em agar chocolate, no qual as hemácias são previamente rompidas pelo aquecimento a 70°C por 10 min. As colônias γ -hemolíticas não produzem nenhuma alteração no meio de cultura. Um sistema tradicional de classificação dos estreptococos β -hemolíticos tem como base as diferenças antigênicas dos carboidratos da parede celular. Essa classificação, proposta por Rebecca Lancefield em 1933, divide os estreptococos em grupos antigênicos designados por letras maiúsculas, sendo os grupos A, B, C, D e G os mais comumente encontrados em humanos. No entanto, nem todas as espécies do gênero são passíveis de classificação por esse método, como é o caso de *S. pneumoniae*. Mais recentemente, técnicas de biologia molecular mostraram que cepas geneticamente relacionadas podem produzir antígenos de Lancefield diferentes, assim como espécies filogeneticamente distantes podem expressar o mesmo antígeno (Ruoff, 2003; Bisno, 2005).

Os estreptococos α -hemolíticos de importância médica incluem *S. pneumoniae* e os estreptococos do grupo viridans. O grupo viridans é composto por diversas espécies que fazem parte da microbiota normal da cavidade oral, trato gastrointestinal e genital feminino, e são associados com endocardite subaguda, cárie dentária e infecções piogênicas, estas últimas especialmente em pacientes neutropênicos. Raramente provocam meningite, sendo responsáveis por 0,3 a 5% dos casos confirmados por cultura. São compostos pelos grupos Anginosus, Mutans, Salivarius e Mitis (Ruoff, 2003; Bisno, 2005; Johnson, 2005). Kawamura e cols. (1995), utilizando a técnica de sequenciamento da fração 16S do RNA ribossomal,

demonstraram que *S. pneumoniae* é geneticamente relacionado às espécies do grupo Mitis (Kawamura *et al.*, 1995).

2.2.3 Identificação

S. pneumoniae é visualizado nos espécimes clínicos, como escarro e LCR, como cocos aos pares (diplococos), gram-positivos (DGP). Eventualmente podem parecer gram-negativos, especialmente após uso de antimicrobianos ou quando provenientes de culturas velhas (Finland, 1982). Devido à geração de H₂O₂ por uma flavoenzima, esta bactéria cresce melhor em meios com fontes de catalase, como hemácias. A identificação de *S. pneumoniae* no laboratório de microbiologia é classicamente baseada em quatro reações: (1) observação de α -hemólise ao redor das colônias no agar sangue ou agar chocolate; (2) teste de catalase negativo; (3) sensibilidade à optoquina; e (4) solubilidade em sais biliares (Musher, 2005).

A diferenciação entre *S. pneumoniae* e os estreptococos do grupo viridans geralmente é feita através da demonstração de sensibilidade à optoquina e a solubilidade em sais biliares. A optoquina é um análogo do quinino sem utilidade terapêutica devido à sua toxicidade. A sensibilidade à optoquina é definida pela presença de um halo de inibição ao redor de um disco contendo 5 μ g da droga (diâmetro do halo de 12 mm a 18 mm, dependendo do fabricante do disco). A solubilidade em sais biliares (deoxicolato de sódio) é demonstrada pelo desaparecimento da opacidade em um tubo contendo uma suspensão da bactéria incubada a 37°C por cerca de 2 horas (Pikis *et al.*, 2001). Tais testes geralmente são considerados suficientes para a identificação de amostras obtidas de sítios estéreis. O teste de susceptibilidade à optoquina apresenta uma sensibilidade e

especificidade reportada na literatura de 99% e 98%, respectivamente. Ocasionalmente, estreptococos do grupo viridans podem mostrar-se sensíveis à optoquina, o que torna o uso desta técnica problemático para a identificação de *S. pneumoniae* a partir de espécimes obtidos de sítios não estéreis. Nesses casos, é utilizado o teste de solubilidade em sais biliares, cuja especificidade é considerada superior à do teste de optoquina. A sensibilidade da solubilidade em sais biliares, no entanto, é relativamente baixa (86%), sendo recomendável a realização de outros testes quando o método é negativo, como o teste de Quellung (Chandler *et al.*, 2000; Arbique *et al.*, 2004; Winn Jr., 2006). O teste da optoquina sofre, ainda, variações de acordo com as condições de cultivo do agente (ar ambiente ou atmosfera enriquecida com CO₂), as características do meio e o inóculo, o que interfere na sua sensibilidade (Gardam e Miller, 1998). Já foram relatadas na literatura cepas de *S. pneumoniae* resistentes à optoquina, cepas insolúveis em sais biliares, assim como cepas com ambas características. A existência dessas cepas, chamadas atípicas, representa um desafio para a identificação da espécie e diferenciação de bactérias relacionadas (Pikis *et al.*, 2001; Obregon *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de sistemas comerciais que incorporam testes fisiológicos, bioquímicos e enzimáticos representou um avanço na identificação de *Streptococcus*, *Enterococcus* e bactérias *Streptococcus*-símile selecionadas. No entanto, estes testes não diferenciam *S. pneumoniae* dos demais componentes do grupo Mitis de forma segura, sendo relatada uma acurácia de 75-79% para o teste Rapid ID 32 Strep[®] (BioMérieux) (Kawamura *et al.*, 1999; Winn Jr., 2006).

Vários kits comerciais, baseados na aglutinação de partículas de látex, estão disponíveis para a identificação rápida de *S. pneumoniae*. Esses testes utilizam um reagente contendo anticorpos contra todos os sorotipos conhecidos de *S.*

pneumoniae. A detecção da cápsula polissacarídica de *S. pneumoniae* através do uso desses testes é considerada essencial para o diagnóstico definitivo da espécie. No entanto, são limitações importantes desses testes a existência de bactérias não capsuladas (falso negativo), que não produzem infecção invasiva, e a reação cruzada entre os anticorpos capsulares e certas cepas de estreptococos viridans (falso positivo). A sensibilidade e a especificidade desse método relatadas na literatura são de 99-100% e 85,1-98%, respectivamente (Winn Jr., 2006).

A determinação do sorotipo (sorotipagem) é realizada através do teste de Quellung, provocado pela reação entre os anticorpos específicos e o polissacarídeo da cápsula do sorotipo correspondente. Ao se observar as células do pneumococo sensibilizadas pelo antisoro específico sob microscopia óptica, após coloração com azul de metileno, é notada uma mudança na refração da cápsula. Esta aparece entumescida, em comparação com um preparado feito com a suspensão da bactéria e salina, ao invés do antisoro. O mesmo processo pode ser realizado com o intuito de se identificar apenas o sorogrupo ao qual a amostra em estudo pertence, nesse caso sendo utilizado antisoros contendo anticorpos contra todos os sorotipos de cada sorogrupo. Outro modo de se identificar o sorotipo é através de testes de aglutinação que empreguem antisoros combinados, contemplando um grupo de sorotipos. Se a suspensão da bactéria reagir com um determinado grupo, então testes com antisoros específicos para cada sorotipo contido neste grupo são realizados (Winn Jr., 2006).

Métodos moleculares de identificação, tais como PCR para amplificação de genes codificadores de fatores de virulência (*lytA* – autolisina; *ply* – pneumolisina) ou das proteínas que ligam penicilina (PBP, do inglês *penicillin-binding proteins*), assim como testes utilizando sondas de hibridização do gene da fração 16S do

rRNA, vêm se tornando ferramentas cada vez mais populares. No entanto, os testes que detectam os genes *lytA* e *ply* não são capazes de diferenciar de forma segura *S. pneumoniae* dos outros componentes do grupo Mitis, pois já foi demonstrada a expressão de tais genes por algumas poucas bactérias deste grupo (Neeleman *et al.*, 2004). O teste comercial que utiliza a sonda de hibridização do gene da fração 16S do rRNA apresenta a mesma limitação, pois o grau de homologia entre as seqüências desse gene nas outras espécies do grupo Mitis e em *S. pneumoniae* é de mais de 99% (Kawamura *et al.*, 1999).

Atualmente, o teste considerado padrão ouro para a identificação e diferenciação entre espécies é a hibridização do DNA genômico. Quando a homologia DNA-DNA supera os 70%, se considera a amostra testada como pertencente à mesma espécie da bactéria utilizada como padrão. A homologia entre *S. pneumoniae* e as demais espécies do grupo Mitis é de 40 a 60%. No entanto, esta técnica é cara e não factível para a imensa maioria dos laboratórios de análise clínica (Kawamura *et al.*, 1999; Arbique *et al.*, 2004).

Recentemente foi descrita uma nova espécie do grupo Mitis, *Streptococcus pseudopneumoniae*, pela demonstração de um grau de homologia na reassociação de DNA menor do que 70% em relação às cepas padrão das demais espécies do grupo. A diferenciação entre a nova espécie e *S. pneumoniae* é feita através da demonstração de sensibilidade à optoquina em ar ambiente, de resistência à optoquina em atmosfera com 5% de CO₂, da insolubilidade em sais biliares, ausência de cápsula e genotipagem. Das três características fenotípicas, a de maior especificidade é a insolubilidade em sais biliares. Os testes moleculares, tais como sequenciamento da fração 16S do RNA ribossomal e a PCR para genes *ply* e *lytA*, não diferenciam de forma segura as duas espécies (Arbique *et al.*, 2004).

2.2.4 Fatores de virulência

Praticamente todas as amostras clínicas de *S. pneumoniae* contêm uma cápsula externa constituída por polissacarídeos. Cepas não-encapsuladas raramente provocam doença, sendo geralmente associadas a surtos de conjuntivite. A cápsula de *S. pneumoniae* é o principal fator de virulência da bactéria – cepas modificadas geneticamente de modo a não produzirem cápsula perdem a virulência. Ela é a principal responsável pela capacidade do agente de resistir à fagocitose, na ausência de opsoninas, e à morte intracelular nas células fagocíticas, o que é provavelmente explicado pelos seguintes fatores: (a) ausência de receptores nas células fagocíticas para os polissacarídeos capsulares; (b) presença de forças eletroquímicas que repelem as células fagocíticas; (c) mascaramento de anticorpos e fatores de complemento ligados à parede celular da bactéria; (d) inativação do complemento (Musher, 2005; Winn Jr., 2006).

As propriedades imunobiológicas da cápsula permitem dividir a espécie em sorotipos. Com base nas diferenças antigênicas do polissacarídeo capsular já foram detectados 90 sorotipos de *S. pneumoniae*. No sistema americano, os sorotipos são numerados de 1 a 90 na ordem em que foram descritos. Já o sistema dinamarquês, mais amplamente aceito, agrupa os 90 sorotipos em 46 sorogrupos, de acordo com semelhanças imunológicas (Hausdorff *et al.*, 2005). Geralmente, o primeiro sorotipo identificado daquele sorogrupo é denominado F (do inglês “first”, primeiro) e os demais recebem as letras A, B, C, *etc.*, de acordo com a ordem em que foram descritos (*e.g.* 18F, 18A, 18B e 18C). Alguns sorotipos, (*e.g.* sorotipo 3) apresentam propriedades biológicas que conferem maior agressividade, e cepas que pertencem a diferentes sorotipos capsulares variam na sua capacidade de estimular uma

resposta humoral adequada. Conseqüentemente, certos sorotipos apresentam maior virulência do que outros. De fato, 23 sorotipos de *S. pneumoniae* são responsáveis por mais de 88% dos casos de bacteremia e meningite. Alguns sorotipos estão mais associados com doença em crianças, como os dos sorogrupos 6, 14, 18, 19 e 23. Já os sorogrupos 1, 3, 4, 7, 8 e 12 predominam em adultos (Musher, 2005; Winn Jr., 2006; SSI, 2007a; SSI, 2007b). A distribuição de sorotipos varia também de acordo com a doença, com a região geográfica e o tempo (Hausdorff *et al.*, 2000). No Brasil, os sorotipos mais freqüentemente associados à pneumonia entre crianças menores de 5 anos são 14 (38,6%), 1 (14,9%) e 5 (8,7%), enquanto os mais freqüentemente associados à meningite são 14 (19,1%), 6B (10,1%) e 18C (8,7%), na mesma faixa etária. Dos 6 aos 49 anos os sorotipos mais prevalentes entre os pacientes com pneumonia são 1 (18,9%), 9V (7,5%) e o 3 (6,6%), enquanto os mais relacionados à meningite são 1 (9,7%), 3 (7,1%) e 18C (6,1%). Entre as pessoas com mais de 50 anos, os sorotipos que mais freqüentemente causam meningite são os 3 (20,2%), 10A (6,1%) e 4/19F/23F, estes últimos com 5% cada. Já entre as causas de pneumonia, predominam os sorotipos 14 (13,3%), 3 (11,1%) e 1/6B/9V, com 6,7% cada (Brandileone *et al.*, 2003).

Anticorpos específicos contra os antígenos capsulares polissacarídeos conferem proteção contra a infecção causada por *S. pneumoniae* daquele sorotipo. A descoberta da natureza humoral da imunidade contra *S. pneumoniae* forneceu os subsídios para o uso de anti-soros específicos para o tratamento de pneumonia, na era pré-antibiótica, e permitiu o desenvolvimento de vacinas polissacarídicas e conjugadas contra os sorotipos que mais freqüentemente causam infecção humana. No entanto, estudos recentes mostram uma alteração na prevalência dos sorotipos de *S. pneumoniae* em comunidades onde foi implementado o uso em massa da

vacina antipneumocócica conjugada, com substituição dos sorotipos contemplados pela vacina por sorotipos mais raros. A substituição de sorotipos (*serotype replacement*) pode ocorrer devido à expansão de clones com fenótipos não vacinais previamente presentes, à emergência de novos clones com fenótipos não vacinais, ou à troca de cápsula entre clones usualmente associados a sorotipos vacinais e outros associados a sorotipos não vacinais (*capsular switch variants*). O fenômeno da troca de cápsula se deve à capacidade do agente incorporar material genético de outros organismos, incluindo os genes responsáveis pelas características antigênicas da cápsula, o que é conhecido por transformação (Musher, 2005; Beall *et al.*, 2006). Conseqüentemente, vários genótipos de *S. pneumoniae*, definidos por técnicas de biologia molecular como a tipagem por seqüenciamento de múltiplos *loci* (MLST, do inglês *multilocus sequence typing*) e a eletroforese em gel sob campo pulsado (PFGE, do inglês *pulsed field gel electrophoresis*), podem expressar o mesmo antígeno capsular polissacarídeo, assim como um único genótipo pode expressar sorotipos distintos (Hanage *et al.*, 2005; Hausdorff *et al.*, 2005; Beall *et al.*, 2006).

A pneumolisina é também um importante fator de virulência de *S. pneumoniae*. Esta toxina é produzida por virtualmente todos os isolados clínicos, independentemente do sorotipo capsular. Trata-se de uma proteína de 53kd, com propriedade de formar poros nas membranas celulares que contenham colesterol. Em baixa concentração, provavelmente encontrada na fase inicial da infecção, essa toxina é capaz de induzir apoptose, ativar a via clássica do complemento e induzir reações pró-inflamatórias. Em concentração mais alta, também chamada concentração lítica, provoca lesão celular e tecidual direta através da formação de poros nas membranas das células do hospedeiro. Vários estudos *in vitro* ou em

modelo animal, utilizando amostras de *S. pneumoniae* geneticamente modificadas de modo a não produzir a pneumolisina, foram realizados. Quando comparadas com amostras selvagens, as amostras que não produzem pneumolisina apresentam menor capacidade de aderir a células epiteliais do trato respiratório, *in vitro*, e são menos eficazes na colonização da nasofaringe, *in vivo*; induzem uma resposta inflamatória pulmonar e sistêmica mais lenta e menos intensa; são incapazes de invadir células endoteliais; e produzem uma meningite atenuada, com menor lesão ependimária e sintomas mais brandos (Hirst *et al.*, 2004).

Outros fatores que contribuem para a virulência deste patógeno são as adesinas, a autolisina e a neuroaminidase. As adesinas, *e.g.* proteínas que ligam colina (Cbp, do inglês *choline binding protein*), são um grupo de moléculas responsável pela adesão do patógeno às células do epitélio da nasofaringe, permitindo a colonização do hospedeiro, e pelo processo de endocitose, que permite a invasão do epitélio e conseqüente bacteremia e disseminação hematogênica. A adesina Cbp A parece mediar também o mecanismo de penetração no SNC através das células endoteliais. As proteínas de superfície pneumocócica A e C (Psp A e Psp C) pertencem à família das Cbp, mas não estão envolvidas no processo de adesão. As Psp contribuem para evitar a fagocitose, provavelmente por bloquear a adesão de fatores de complemento. A autolisina, enzima responsável pelo remodelamento da parede celular do pneumococo, aumenta a virulência do patógeno por permitir a liberação de substâncias tóxicas e estimuladoras da resposta imune, como pneumolisina e peptidoglicano. Já a neuroaminidase contribui no processo de adesão às células epiteliais (Musher, 2005; Tunkel, 2005b).

Os principais fatores responsáveis pela gravidade das infecções causadas por *S. pneumoniae* são os constituintes de sua parede celular, tais como os ácidos

teicóico e lipoteicóico e o peptidoglicano. São eles os mais potentes desencadeadores da intensa resposta inflamatória que caracteriza a doença pneumocócica, cuja morbidade é diretamente proporcional à inflamação dos tecidos atingidos (Musher, 2005).

2.2.5 Fisiopatogenia

A história natural da meningite pneumocócica se inicia com a colonização da nasofaringe por *S. pneumoniae*. A adesão de *S. pneumoniae* ao epitélio da nasofaringe ocorre pela interação de moléculas de superfície pneumocócicas e receptores das células epiteliais. A principal molécula envolvida no processo de adesão é a Cbp A, a mais abundante das Cbp. Bactérias mutantes que não possuem a Cbp A são incapazes de colonizar a nasofaringe, num modelo murino. Outras moléculas envolvidas na adesão do agente ao epitélio nasofaríngeo são as Cbp D, E e G. São possíveis fatores adjuvantes para a adesão a neuroaminidase, que diminui a viscosidade do muco e expõe receptores de superfície do epitélio ao pneumococo, e a protease IgA1, que degrada a IgA secretória (Koedel *et al.*, 2002).

A invasão do epitélio, após a colonização, ocorre através do processo de endocitose, mediado pelo receptor de imunoglobulina polimérica, no epitélio, e a Cbp A pneumocócica. Neste processo, *S. pneumoniae* se aproveita de um mecanismo utilizado para o transporte de imunoglobulinas para atravessar o epitélio nasofaríngeo e ganhar a corrente sanguínea. Contribui ainda para esse processo a hialuronidase, que degrada o ácido hialurônico, facilitando a disseminação da bactéria pelos tecidos do hospedeiro (Koedel *et al.*, 2002; Winn Jr., 2006).

A sobrevivência de *S. pneumoniae* no sangue é devida majoritariamente às

propriedades antifagocitárias da sua cápsula polissacarídea (vide seção 2.2.2). Também contribuem para a persistência do patógeno no sangue as proteínas de superfície A e C (Psp A e C), ao inibir a ativação e promover a degradação do fator C3b do complemento, respectivamente. A pneumolisina, devido à sua capacidade de ativar a via clássica do complemento na ausência de anticorpos específicos, promove o consumo desses fatores, com conseqüente diminuição da atividade sérica de opsonização. Todos esses fatores promovem a sobrevivência de *S. pneumoniae* no sangue por anularem o principal mecanismo de defesa contra esse patógeno, ou seja, a opsonização e posterior fagocitose (Koedel *et al.*, 2002).

A bacteremia sustentada parece ser um requisito necessário, porém não suficiente, para a invasão do espaço subaracnóideo por *S. pneumoniae*. Existem duas barreiras separando o sangue do SNC: a BHE e a barreira hematoliquórica. A BHE é composta pelas células endoteliais da microvasculatura cerebral. Essas células diferem das demais células endoteliais por possuírem: (1) junções ocludentes (*tight junctions*) com resistência elétrica extremamente alta, que limita o transporte intercelular; (2) atividade pinocítica diminuída, o que limita o transporte transcelular; e (3) sistemas de transporte específicos. A barreira hematoliquórica localiza-se nos plexos coróides e é formada pelo endotélio dos capilares aí localizados, assim como pelo epitélio contínuo ao epêndima dos ventrículos. O local exato da penetração de *S. pneumoniae* no SNC ainda é desconhecido, mas algumas evidências experimentais sugerem ser o endotélio cérebro-vascular, e não o epitélio do plexo coróide, a principal via de acesso deste patógeno. Num modelo *in vitro* utilizando células endoteliais humanas e murinas, foi demonstrado o transporte de *S. pneumoniae* da superfície apical para a superfície basal do endotélio, num processo mediado pela Cbp A pneumocócica e pelo receptor do fator de ativação plaquetária,

no endotélio. Esse mecanismo, denominado transcitose, é, portanto, um possível mecanismo para a invasão da BHE (Koedel *et al.*, 2002).

Outros mecanismos podem contribuir para a invasão de *S. pneumoniae* no espaço subaracnóide, além da penetração pela BHE. Nos pacientes com fístula líquórica, *e.g.* após traumatismo craniano, a interrupção da integridade da dura máter permite a entrada direta de *S. pneumoniae* a partir de focos infecciosos adjacentes, como otite média, sinusite e mastoidite (Musher, 2005). A invasão direta do SNC a partir da colonização da nasofaringe, através de transponte axonal retrógrado via nervos olfatórios, é uma hipótese que não pode ser descartada. Num modelo em camundongos, após inoculação nasal, foi observada infecção por *S. pneumoniae* (comprovada por cultura, PCR e visualização direta) nos nervos olfatórios, bulbo olfatório, tecido cerebral e gânglio trigeminal, na ausência de bacteremia (van Ginkel *et al.*, 2003).

A sobrevivência de *S. pneumoniae* no espaço subaracnóideo é proporcionada pela baixíssima atividade de opsonização e bactericida do LCR. Isso é consequência das diminutas quantidades de complemento (virtualmente ausente) e de imunoglobulinas (relação sangue:LCR de aproximadamente 800:1) no LCR. Com a resposta inflamatória desencadeada pela presença da bactéria, ocorre um ligeiro aumento da concentração desses fatores, porém insuficiente para proporcionar uma atividade de opsonização adequada. Conseqüentemente, o intenso influxo de leucócitos verificado na meningite pneumocócica não leva à esterilização do LCR, em virtude da insuficiência dos fatores humorais acima citados, fundamentais para a fagocitose e morte do pneumococo (Tunkel, 2005b).

Apesar de seu papel fundamental para a sobrevivência de *S. pneumoniae* no sangue e no espaço subaracnóideo, a cápsula polissacarídica não parece estar

relacionada à extensa reação inflamatória observada na meningite pneumocócica. Em modelos animais, a infusão intracisternal dos polissacarídeos de *S. pneumoniae*, assim como a de cepas encapsuladas mortas, não é capaz de reproduzir a reação inflamatória característica da doença, ao contrário da infusão de cepas não encapsuladas vivas ou dos constituintes da parede celular, ácidos teicóico e lipoteicóico e peptidoglicano, isoladamente (Koedel *et al.*, 2002). Não está claro ainda se essas substâncias induzem inflamação diretamente ou através do estímulo à liberação de citocinas, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1). A hipótese de que a liberação desses componentes de parede celular, durante a autólise induzida pela antibioticoterapia, levaria a uma exacerbação da resposta inflamatória e, conseqüentemente, a uma maior morbiletalidade foi reforçada pela observação de que o uso de dexamentasona, antes ou concomitante ao início da antibioticoterapia, se correlacionou com melhor prognóstico nos pacientes com meningite pneumocócica comprovada (de Gans e van de Beek, 2002; Tunkel, 2005b).

2.2.6 Epidemiologia

2.2.6.1 *Aspectos gerais*

O principal nicho ecológico de *S. pneumoniae* é a nasofaringe humana. Cinco a 10% dos adultos saudáveis são carreadores de *S. pneumoniae*, enquanto 20 a 40% das crianças saudáveis apresentam colonização de nasofaringe por esta bactéria. Em populações fechadas, como crianças pequenas que freqüentam creche, esse percentual pode chegar a 65%. A prevalência de colonização aumenta

até os 2 ou 3 anos de vida, quando cerca de 40 a 60% das crianças encontram-se colonizadas, diminuindo subseqüentemente (Craig *et al.*, 1999; Bogaert *et al.*, 2004; Musher, 2005; Winn Jr., 2006). A aquisição de *S. pneumoniae* ocorre nos primeiros meses de vida. Num estudo longitudinal em que 213 recém-nascidos foram rastreados para aquisição (definida como primeiro isolamento de um dado sorotipo) e colonização por *S. pneumoniae*, 15% dos lactentes já haviam adquirido a bactéria na 4ª semana de vida. Aos 3 meses, esse percentual havia subido para 38% e aos 6 meses, para 54% (Sleeman *et al.*, 2005). Lactentes permanecem colonizados por cerca de 4 meses por um mesmo sorotipo. Em adultos a colonização por um dado sorotipo persiste por um período menor, geralmente de 2 a 4 semanas, mas pode ser mais duradoura (Winn Jr., 2006). A colonização simultânea por mais de um sorotipo pode ocorrer (Sleeman *et al.*, 2005).

A colonização é fator indispensável para a ocorrência de infecção por *S. pneumoniae*. A imunidade humoral de mucosa e a competição exercida pela microbiota normal de oro/nasofaringe atuam como fatores protetores contra a colonização. A transmissão de *S. pneumoniae* de pessoa a pessoa através de gotículas respiratórias é bem documentada, o que explica a maior prevalência de colonização em populações fechadas. Além da aglomeração, são fatores de risco independentes para a colonização por *S. pneumoniae*: etnia (negros ou nativos norte-americanos, nos EUA), tabagismo (ativo e passivo), família numerosa (especialmente grande número de irmãos mais velhos), baixo nível sócio-econômico, uso recente de antibiótico (Bogaert *et al.*, 2004; Greenberg *et al.*, 2006). O percentual de colonização aumenta durante os episódios de doença viral respiratória. Certas causas de imunodeficiência, como anemia falciforme e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency*

virus), não estão relacionadas a uma maior taxa de colonização em crianças, apesar de serem fatores de risco conhecidos para doença pneumocócica, já que a barreira mucosa, incluindo a resposta imune local, não está afetada nesses casos (Bogaert *et al.*, 2004; Nicoletti *et al.*, 2007).

S. pneumoniae é um comensal bem adaptado, já que a progressão do estado de portador para a infecção é um evento relativamente raro (Crook e Spratt, 1998). A invasividade de *S. pneumoniae*, definida como a freqüência relativa com que uma cepa é isolada da nasofaringe *versus* a freqüência com que é isolada de sítios estéreis, parece ser função do sorotipo. Os sorotipos 1, 4, 5, 7F, 9A e 14 são altamente invasivos (Hausdorff *et al.*, 2005; Sleeman *et al.*, 2006). A freqüência e a duração da colonização também variam entre os sorotipos. Os sorotipos que colonizam a nasofaringe das crianças mais freqüentemente e por períodos longos estão, na sua maioria, representados na vacina VCP7, ou são sorotipos relacionados, como 6A e 19A. Os sorotipos 1, 5 e 46 raramente são isolados da nasofaringe, mesmo em populações nas quais causam um percentual expressivo de doença invasiva. Já o sorotipo 3 coloniza a nasofaringe freqüentemente, porém por períodos curtos (Hausdorff *et al.*, 2005). Sleeman e cols. (2006) demonstraram haver uma relação inversa entre a duração da colonização e a invasividade de um dado sorotipo (Sleeman *et al.*, 2006).

Tanto a infecção quanto a colonização por *S. pneumoniae* levam à formação de níveis séricos mensuráveis de anticorpos anti-capsulares sorotipo-específicos. Inúmeras evidências apontam para o papel protetor desses anticorpos. Após a aquisição de uma cepa de *S. pneumoniae*, e na ausência de fatores que predisponham à infecção, como a obstrução dos óstios de drenagem de seios da face ou alterações no aparato mucociliar do epitélio respiratório, é bastante provável

que os anticorpos protetores sejam formados antes que ocorra a infecção. A doença pneumocócica, portanto, geralmente ocorre pouco após o início da colonização por *S. pneumoniae*, antes da produção de anticorpos e estabelecimento de uma imunidade humoral sorotipo específica adequada. Analogamente, pessoas com produção inadequada de resposta imune humoral, como portadores de mieloma múltiplo e Aids, continuam sob risco de doença pneumocócica ao longo de todo o período de colonização, o que explica a maior prevalência da doença nesses grupos (Musher, 2003; Musher, 2005).

A taxa de incidência de doença invasiva por *S. pneumoniae*, definida como isolamento do agente de espécimes clínicos normalmente estéreis (e.g. sangue, LCR, líquido pleural), é em média de 11 a 17 casos por 100.000 habitantes ao ano nos países desenvolvidos (Low, 2005). Certas populações, como nativos americanos nos EUA e aborígenes na Austrália, apresentam taxas de incidência até 10 vezes maiores (Musher, 2005; Watt *et al.*, 2007). Idosos que vivem em clínicas e asilos apresentam uma incidência 14 vezes maior de doença pneumocócica invasiva (DPI) do que idosos não institucionalizados (Nuorti *et al.*, 1998).

A DPI é mais freqüente nos extremos etários, sendo sua incidência maior em crianças abaixo de 2 anos e adultos acima de 65 anos, em comparação a crianças mais velhas e adultos jovens (Robinson *et al.*, 2001). Nos primeiros meses de vida a maioria dos lactentes está relativamente protegida, devido à imunidade conferida pela passagem de anticorpos maternos pela placenta. A imunidade contra *S. pneumoniae* vai aumentando a partir dos 3 anos de idade, às custas de infecções inaparentes ou sintomáticas, voltando a diminuir na senescência, devido ao envelhecimento do sistema imune, ao comprometimento dos mecanismos mucociliares do epitélio do trato respiratório, à desnutrição e à presença de co-

morbidades, como o diabetes mellito. A incidência da doença pneumocócica apresenta uma variação sazonal, com maior incidência nos meses mais frios, coincidindo com os picos de incidência de doença respiratória viral (Baldy, 2005; Musher, 2005; Winn Jr., 2006).

A transmissão de *S. pneumoniae* se dá através do contato íntimo ou por gotículas de secreção respiratória (Musher, 2003). *S. pneumoniae* já foi cultivado de secreção seca e do ar e de poeira de hospital, porém a transmissão por essas vias raramente é descrita (Finland, 1982). Também já foi documentada a infecção respiratória provocada por *S. pneumoniae* em cavalos. Um estudo mostrou que as cepas envolvidas nas infecções eqüinas são geneticamente relacionadas e não expressam certos fatores de virulência, como a atividade hemolítica conferida pela pneumolisina. Não foi descrita a transmissão de *S. pneumoniae* de cavalos para o homem, tampouco a transmissão de cepas humanas para cavalos (Whatmore *et al.*, 1999). A transmissão intrafamiliar de *S. pneumoniae*, majoritariamente de crianças pequenas para irmãos, pais e avós, é bem documentada (Hoshino *et al.*, 2002; Shimada *et al.*, 2002; Hausdorff *et al.*, 2005). A presença de crianças que freqüentam creche é fator de risco para DPI em familiares adultos (Nuorti *et al.*, 2000). Estudos de biologia molecular permitiram tanto identificar o hábito de freqüentar creches como um fator associado à colonização por cepas resistentes, como documentar a transmissão de cepas resistentes e geneticamente relacionadas das crianças para seus pais (Pons *et al.*, 1996; Hoshino *et al.*, 2002). Apesar do potencial de causar epidemias, especialmente em condições de confinamento, a doença pneumocócica não é usualmente associada a casos secundários ou aglomerado de casos e, portanto, não é considerada contagiosa (Musher, 2003). Conseqüentemente, não são recomendadas medidas secundárias após o

diagnóstico de um caso de doença pneumocócica (pneumonia, meningite, outras), tais como isolamento ou quimioprofilaxia (Musher, 2003; Brasil, 2005a). No entanto, o uso de vacinação em situações de surto em unidades fechadas vem sendo descrito desde o início do século passado, com bons resultados (Finland, 1982; Dagan *et al.*, 2000; Musher, 2005). Analogamente, existem vários relatos na literatura do uso de quimioprofilaxia com antibióticos (*e.g.* rifampicina com ou sem clindamicina, penicilina V, ofloxacina com ou sem rifampicina) para abortar surtos de DPI em unidades fechadas. Contudo, a eficácia de tal estratégia ainda não foi claramente definida (Nuorti *et al.*, 1998; Craig *et al.*, 1999).

S. pneumoniae é a principal causa de pneumonia bacteriana comunitária e divide com *H. influenzae* não tipável o posto de principal causa de otite média aguda e sinusite bacteriana aguda. É a principal causa de MBA em adultos e crianças nos países desenvolvidos (Musher, 2005). No Brasil, onde a principal causa de MBA ainda é *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* passou a ser a segunda maior causa desta enfermidade após a introdução da vacina conjugada contra Hib em 1999 (Brasil, 2005a). É ainda uma causa importante de bacteremia, sendo responsável por 5 a 25% das bacteremias de origem comunitária, de acordo com alguns estudos realizados na Espanha, Nova Zelândia, Jordânia e Kênia, este último restrito à população abaixo de 13 anos (Nimri e Batchoun, 2004; Berkley *et al.*, 2005; Cisneros-Herreros *et al.*, 2005; Raymond *et al.*, 2006). As bacteremias por *S. pneumoniae* são em sua maioria associadas ao foco pulmonar. Num estudo realizado com pacientes adultos em Israel, a bacteremia por *S. pneumoniae* esteve associada com pneumonia em 70,8%, com meningite em 7,5% e sinusite ou otite em 4,2% dos casos. Em 17,5% dos pacientes um foco não pôde ser detectado, e a bacteremia foi considerada como primária (Raz *et al.*, 1997). *S. pneumoniae* é uma

causa infreqüente de endocardite, pericardite, osteomielite, artrite séptica, peritonite, infecções da pelve feminina, infecções neonatais e infecções de partes moles. Nesses casos, a maioria dos pacientes tem alguma doença de base, como diabetes ou neoplasias, e apresenta algum outro foco concomitante, como pneumonia ou meningite. *S. pneumoniae* é causa de menos de 3% das endocardites, na população geral, e de 3 a 7% dos casos de endocardite na população pediátrica (Winn Jr., 2006).

S. pneumoniae causa infecção do ouvido médio, seios da face, traquéia, brônquios e parênquima pulmonar por disseminação direta a partir da colonização da nasofaringe. Geralmente os mecanismos de limpeza desses sítios, especialmente o movimento mucociliar do epitélio, são suficientes para eliminar *S. pneumoniae* e evitar a infecção local. Portanto, condições que interferem com tais mecanismos depuradores, como os processos alérgicos, infecções virais, obstruções mecânicas, tabagismo, exposição ocupacional, entre outros, são fatores predisponentes para as infecções citadas. Já as infecções do SNC, válvulas cardíacas, ossos, articulações, pericárdio e peritônio são de origem hematogênica. A pneumonia também pode se desenvolver por esta via. *S. pneumoniae* pode ganhar a corrente sangüínea a partir de um foco primário, como a pneumonia, ou diretamente, pela penetração na mucosa da nasofaringe. São fatores predisponentes para doença invasiva por *S. pneumoniae* aqueles associados a uma imunodeficiência, em particular uma deficiência na imunidade humoral, como as doenças hematológicas, a asplenia funcional ou anatômica, a idade avançada, Aids, deficiência de complemento, hipogamaglobulinemia, doenças crônicas (doença pulmonar obstrutiva crônica - DPOC, insuficiência cardíaca, cirrose, insuficiência renal, diabetes), tabagismo e etilismo. Fatores sócio-econômicos, como menor escolaridade, piores condições de

moradia e desemprego, e étnicos, como ser da raça negra, também estão associados à DPI (Nery-Guimaraes *et al.*, 1981; Nuorti *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2001; Watt *et al.*, 2007). A infecção do SNC pode ocorrer ainda por penetração direta a partir de focos parameningeos, como ocorre nos pacientes com fístula líquórica e naqueles com implante coclear (Reefhuis *et al.*, 2003; Musher, 2005). A infecção da pleura pode ocorrer via hematogênica ou por disseminação direta a partir da infecção do parênquima pulmonar. Raramente *S. pneumoniae* coloniza o trato genital feminino, de onde ele pode partir para causar as infecções pélvicas e a peritonite, na mulher, e as infecções neonatais, após a colonização do recém-nascido durante a passagem pelo canal do parto (Musher, 2005; Winn Jr., 2006).

A meningite por *S. pneumoniae* é a que apresenta maior taxa de morbiletalidade, quando comparada com aquelas causadas por Hib e por *N. meningitidis*. Duas grandes séries de casos de meningite pneumocócica realizadas na Dinamarca e na Holanda, e publicadas recentemente, relataram um percentual de seqüelas neurológicas variando entre 30 a 41% dos casos, com taxas de letalidade entre 21 e 30% (Ostergaard *et al.*, 2005; Weisfelt *et al.*, 2006). Além disso, num outro estudo do mesmo grupo holandês, cerca de 27% dos pacientes com meningite pneumocócica clinicamente sem seqüelas no momento da alta apresentaram evidência de disfunção cognitiva, quando submetidos a uma avaliação neuropsicológica mais rigorosa, contra 4% dos pacientes convalescentes de meningite meningocócica e controles saudáveis (van de Beek *et al.*, 2002). A taxa de letalidade aumenta de acordo com a idade, sendo maior também nos países em desenvolvimento, em comparação com os países desenvolvidos (Koedel *et al.*, 2002).

Nos últimos anos tem ocorrido uma mudança no perfil epidemiológico da doença pneumocócica, em especial da doença invasiva. Isso é reflexo da introdução

da VCP7 no calendário de imunização de alguns países desenvolvidos, do aumento na prevalência da resistência aos antimicrobianos, em especial a resistência aos β -lactâmicos, e o reconhecimento do perfil epidêmico da meningite pneumocócica na África (Koedel *et al.*, 2002; Butler e Levine, 2005; Byington *et al.*, 2005).

2.2.6.2 Meningite pneumocócica com perfil epidêmico

Surtos de doença pneumocócica há muito são descritos. Geralmente tais surtos ocorrem em instituições fechadas, como hospitais, campos militares e abrigos para indigentes, e em pequenas comunidades (Greenwood, 2006). No entanto, recentemente foram descritas epidemias de grandes proporções em países localizados no cinturão de meningite africano, como Burkina Faso e Gana. Nesses países, a meningite pneumocócica apresentou um padrão epidêmico semelhante ao de *N. meningitidis*, com um aumento da incidência cerca de 6 vezes na estação de seca, em comparação com outros períodos do ano. O aumento no número de casos de meningite pneumocócica precedeu o aumento no número de casos de meningite meningocócica em cerca de 1 mês, e atingiu diferentes faixas etárias. O sorotipo mais comumente isolado foi o 1, especialmente no surto de Gana, onde este sorotipo foi responsável por 76% dos casos. A análise molecular por MLST demonstrou serem estas amostras geneticamente relacionadas. O predomínio clonal, a sazonalidade e acometimento de várias faixas etárias são características semelhantes às das epidemias meningocócicas tradicionalmente descritas na região (Leimkugel *et al.*, 2005; Yaro *et al.*, 2006). O sorotipo 1, que já foi a mais freqüente causa de doença pneumocócica esporádica e endêmica nos Estados Unidos, é hoje em dia, neste país, um patógeno relativamente incomum (Butler e Levine, 2005).

Vários pequenos surtos provocados pelo sorotipo 1 vêm sendo relatados desde a primeira metade do século XX, em vários países do mundo. Um dado curioso sobre esse sorotipo é que ele raramente é encontrado em portadores sãos, mesmo em regiões onde é uma causa freqüente de doença invasiva, o que, aliado à sua habilidade em provocar surtos, sugere que este sorotipo tenha uma taxa de ataque mais alta do que os demais (Brueggemann e Spratt, 2003). Este sorotipo não é contemplado pela VCP7, embora faça parte das vacinas conjugadas 9, 11 e 13-valente (ainda não licenciadas) e da vacina polissacarídica 23V. Recentemente, foram relatados surtos de doença invasiva provocados pelo sorotipo 1, no sul de Israel e no norte do Canadá, que foram abortados pelo uso da vacina polissacarídica (Butler e Levine, 2005). O sorotipo 1 é considerado um dos sorotipos mais invasivos e agressivos, já que alguns estudos sugerem que possa estar associado a pneumonia complicada em crianças mais velhas (Tan *et al.*, 2002; Hausdorff *et al.*, 2005). É possível que a maior prevalência do sorotipo 1 nos países subdesenvolvidos seja resultado de um viés de observação, já que nos diversos estudos de distribuição de sorotipos ali realizados ocorre um predomínio de cepas isoladas de doença invasiva grave. No Brasil, por exemplo, num estudo realizado com dados nacionais de vigilância epidemiológica, a imensa maioria (76%) das amostras analisadas foram isoladas de pacientes com meningite, já que na maior parte dos casos brandos de pneumonia e bacteremia o agente etiológico não é identificado e o tratamento é realizado de forma empírica (Brandileone *et al.*, 2003).

O ensaio da PCR tem se mostrado de grande utilidade para a ampliação da vigilância epidemiológica das meningites bacterianas em áreas remotas. Esses locais, em geral, sofrem com a falta de recursos humanos, laboratórios de microbiologia, além de condições ideais de coleta e transporte, o que inviabiliza o

diagnóstico das MBA através de cultura, na maioria dos casos. A técnica da PCR, em contraste, pode ser realizada com amostras conservadas a 4°C ou a -20°C por semanas ou anos, respectivamente, o que demanda uma infraestrutura próxima ao local de ocorrência dos casos mais simples (Sidikou *et al.*, 2003). Estudos de vigilância realizados no continente Africano comprovam o benefício desta técnica molecular, inclusive com a demonstração de que a meningite pneumocócica era subestimada. No estudo de Parent du Chatelet e cols. (2005) a incidência anual da meningite por *S. pneumoniae* foi muito semelhante à por *N. meningitidis* (17 e 19 casos/100.000 habitantes, respectivamente), com padrão sazonal idêntico e maior letalidade, sendo responsável por 61% de todos os óbitos por MBA (Parent du Chatelet *et al.*, 2005). Do mesmo modo, o uso de técnicas mais modernas de microbiologia (sistema automatizado de hemocultura) ampliou a capacidade de vigilância das bacteremias, no Kênia, demonstrando ser *S. pneumoniae* a principal causa de bacteremia na população pediátrica daquele país (Berkley *et al.*, 2005).

Os relatos de bacteremia e meningite pneumocócica na África ilustram a relevância epidemiológica da doença pneumocócica neste continente, a importância de se ampliar a vigilância epidemiológica mediante o emprego de técnicas de microbiologia e de biologia molecular, e a necessidade de se ajustarem as medidas preventivas e de tratamento atualmente recomendadas durante o período epidêmico no cinturão de meningite africano. Tais medidas são baseadas no conceito de que a maioria dos casos de meningite que ocorrem durante a epidemia de meningite são de etiologia meningocócica, desconsiderando, portanto, a participação expressiva de *S. pneumoniae* (Yaro *et al.*, 2006).

2.2.6.3 Resistência aos antimicrobianos

O advento da penicilina, utilizada clinicamente a partir do final da segunda guerra mundial (1943), mudou a história natural da doença pneumocócica. O sucesso terapêutico obtido com o uso da droga se devia à grande sensibilidade do pneumococo à penicilina (CIM $<0,06 \mu\text{g/ml}$), o que permitia o uso dessa substância para o tratamento da meningite pneumocócica, mesmo com a baixa concentração de penicilina obtida no LCR ($1 \mu\text{g/ml}$, na presença de inflamação meníngea) (Tavares, 2001). No entanto, a emergência de cepas com resistência intermediária (CIM entre $0,12$ e $1 \mu\text{g/ml}$) e, principalmente, com resistência de alto grau (CIM $\geq 2 \mu\text{g/ml}$) mudou este cenário, e vem se constituindo num grave problema de saúde pública no mundo todo, assim como a resistência a múltiplos antibióticos e a resistência às cefalosporinas de amplo espectro (Crook e Spratt, 1998; CLSI, 2005 APUD Cardoso *et al.*, 2008).

A resistência intermediária de *S. pneumoniae* à penicilina foi descrita inicialmente em 1967, na Austrália. A resistência de alto grau (CIM $\geq 2 \mu\text{g/ml}$), associada à resistência a múltiplos antibióticos, foi descrita inicialmente em 1977, na África do Sul, e no início dos anos 80, na Espanha. Em 1997, na Coreia, a resistência de *S. pneumoniae* à penicilina (CIM $>0,12 \mu\text{g/ml}$) era da ordem de 80%, sendo 65% de alto grau (CIM $\geq 2 \mu\text{g/ml}$) (Crook e Spratt, 1998; Tavares, 2001). Além da resistência à penicilina, é particularmente preocupante a resistência às cefalosporinas de amplo espectro (*e.g.* ceftriaxona, cefotaxima). Nos EUA, em 1996, 9% das cepas isoladas no sangue eram resistentes à cefotaxima (Crook e Spratt, 1998).

O uso freqüente de antibióticos na população pediátrica foi identificado como

o maior fator de risco para a seleção de resistência pneumocócica (Crook e Spratt, 1998). Além do uso recente de antimicrobianos, são fatores de risco para a doença por pneumococos resistentes: hospitalização recente, freqüentar creche, infecção do trato respiratório alto e idade menor que 15 anos (Crook e Spratt, 1998; Winn Jr., 2006). A resistência antimicrobiana é um fenômeno que se desenvolve durante a colonização da nasofaringe, quando as cepas são expostas por maior tempo à pressão seletiva dos antibióticos e têm contato com outras bactérias comensais, com as quais pode trocar genes de resistência. Logo, os sorotipos mais relacionados com a resistência também são aqueles capazes de colonizar a nasofaringe freqüentemente e por longos períodos, tais como os dos sorogrupos 6, 14, 19 e 23. Ao contrário, sorotipos raramente isolados de carreadores assintomáticos, como o sorotipo 1, ou carreados por períodos relativamente curtos, como o 3, raramente estão associados a resistência (Hausdorff *et al.*, 2005). Além disso, a resistência à penicilina está mais associada aos sorotipos mais encontrados em crianças (6B, 14, 19A, 19F, 23F) do que em adultos (*e.g.* 3), o que provavelmente está relacionado ao uso mais freqüente de antibióticos pela população pediátrica. Além da relação com o sorotipo, existe também uma relação entre a resistência aos antimicrobianos e o genótipo da bactéria. Um exemplo é a emergência de resistência à penicilina, em vários países, devido à importação de cepas resistentes oriundas da Espanha, conforme demonstrado por estudos de biologia molecular realizados nos anos 80 e 90. Ademais, estudos realizados nos EUA mostram que poucos clones são responsáveis por 80% das cepas de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina (Crook e Spratt, 1998; Hausdorff *et al.*, 2005). Estas cepas geneticamente relacionadas podem expressar diferentes sorotipos (Castanheira *et al.*, 2003; Hanage *et al.*, 2005).

A resistência de *S. pneumoniae* à penicilina e às cefalosporinas se deve exclusivamente a alterações no sítio de ligação dos beta-lactâmicos, ou seja, as PBP. Até o presente não foram descritos pneumococos produtores de β -lactamase. *S. pneumoniae* possui 5 PBP de alto peso molecular, sendo que modificações na seqüência dos aminoácidos de PBP1a, PBP2b e PBP2x estão associadas à resistência à penicilina, enquanto a resistência às cefalosporinas está relacionada a alterações de PBP2x e PBP1a. Alterações nas estruturas originais de PBP de *S. pneumoniae* envolveu tanto a troca de material genético com os estreptococos viridans *S. oralis* e *S. mitis* quanto a ocorrência de mutações (Crook e Spratt, 1998). Os pneumococos com alta resistência às penicilinas quase invariavelmente possuem resistência a outros β -lactâmicos. No entanto, como a resistência a cefalosporinas independe da presença de alteração na PBP2b, é possível a ocorrência de cepas altamente resistentes às cefalosporinas de 3ª geração e com resistência intermediária à penicilina (Crook e Spratt, 1998).

A epidemiologia de *S. pneumoniae* vem sendo estudada através de técnicas de biologia molecular, visando a análise da estrutura genética geral dos clones (por PFGE e MLST, entre outras) e a pesquisa dos genes que codificam as PBP1a, PBP2b e PBP2x, além da determinação da expressão fenotípica capsular (sorotipagem). As cepas multirresistentes de ampla distribuição internacional foram assim identificadas e tiveram sua nomenclatura padronizada por uma rede de colaboração internacional denominada Rede de Epidemiologia Molecular Pneumocócica (PMEN, do inglês *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*). A nomenclatura padrão obedece a seguinte fórmula: país/região de origem^{sorotipo} originalmente expresso-número seqüencial na PMEN-sorotipo descrito subsequente. Com isso, foi possível observar diversos fenômenos, como a expansão de certos

clones altamente bem sucedidos, como os clones multirresistentes Spain^{23F}-1 e Spain^{6B}-2, que surgiram na Espanha e se espalharam por vários países do mundo. Outro fenômeno observado foi a emergência de cepas com diferentes genótipo e sorotipo, porém apresentando genes de resistência idênticos, sugerindo expansão horizontal de tais genes de resistência, como ocorrido com os clones Spain^{9V}-3 e Spain^{23F}-1. Tais genes podem tanto ser adquiridos quanto perdidos dentro de uma linhagem clonal. Foi observada também a expressão de diferentes sorotipos por cepas geneticamente idênticas, o que demonstra que a troca de cápsula através do fenômeno de transformação é relativamente freqüente. É o caso das cepas do clone Spain^{9V}-3, que podem expressar diferentes sorotipos, como o original 9V e o sorotipo 14, sua expressão fenotípica mais comum na América Latina (McGee *et al.*, 2001; Castanheira *et al.*, 2003). Conseqüentemente, foi sugerido que a pressão seletiva conferida pela imunidade humoral específica poderia contribuir para a adoção, por clones de pneumococo resistentes, de fenótipos capsulares menos imunogênicos ou não presentes nas vacinas conjugadas (Beall *et al.*, 2006).

A resistência de alto grau à penicilina geralmente está associada à resistência a múltiplos antibióticos, tais como cotrimoxazol, tetraciclina, cloranfenicol e macrolídeos. A resistência à vancomicina, a droga de escolha para o tratamento de meningite por *S. pneumoniae* com resistência de alto grau à penicilina, felizmente ainda não foi registrada (Crook e Spratt, 1998). No entanto, cepas de *S. pneumoniae* tolerantes à vancomicina vêm sendo reportadas desde 1999. A tolerância à vancomicina, isto é, a capacidade de sobreviver mas não de crescer na presença de um antimicrobiano, é precursora do desenvolvimento de resistência (Novak *et al.*, 1999). A tolerância à vancomicina se correlacionou com pior prognóstico tanto em modelos animais quanto em pacientes com meningite pneumocócica (Novak *et al.*,

1999; Rodriguez *et al.*, 2004). Num estudo que analisou 113 pacientes com meningite pneumocócica, a tolerância à vancomicina foi um fator de risco independente para menor sobrevida em 30 dias. Nesse mesmo estudo, a tolerância à vancomicina esteve associada à antibioticoterapia recente e à resistência e tolerância a outros antimicrobianos (Rodriguez *et al.*, 2004).

A resistência aos macrolídeos foi relatada pela primeira vez em meados da década de 60 e é, atualmente, um problema crescente, o que vem colocando em xeque o papel dessa classe de antimicrobianos no tratamento empírico de infecções do trato respiratório (Klugman, 1990; Felmingham *et al.*, 2007). Nos últimos anos, vários trabalhos têm demonstrado uma associação entre resistência aos macrolídeos *in vitro* e falha clínica e microbiológica no tratamento de pacientes com infecções do trato respiratório com estes antibióticos (Klugman e Lonks, 2005). A resistência aos macrolídeos se deve principalmente à metilação do sítio de ligação dos macrolídeos nos ribossomas, o que é feito por uma rRNA metilase codificada pelo gene *erm(B)*. Tal mecanismo confere resistência também às lincosamidas e às estreptograminas (resistência MLS). Outro mecanismo de resistência aos macrolídeos é o efluxo ativo, determinado pelo gene *mef(A)*. Dentre as cepas resistentes, as que apresentam genótipo *erm(B)* predominam na maior parte do mundo. No entanto, as cepas *mef(A)* são as mais prevalentes no Canadá, Grécia e EUA. Cepas apresentando ambos genes de resistência vêm sendo reportadas com frequência crescente, principalmente nos EUA. As cepas *erm(B)* e as *erm(B)+mef(A)* positivas estão associadas à resistência de alto grau à eritromicina ($CIM_{90} \geq 128\mu\text{g/ml}$). Já as cepas que apresentam apenas o gene *mef(A)* costumam ter uma $CIM_{90} < 16\mu\text{g/ml}$, embora já tenham sido relatadas cepas com $CIM > 256\mu\text{g/ml}$ (Crook e Spratt, 1998; Tavares, 2001; Felmingham *et al.*, 2007). São fatores de risco para

aquisição de *S. pneumoniae* resistente aos macrolídeos: uso inapropriado de antibióticos, uso prévio de macrolídeo, aglomeração, extremos de idade (<2 anos e >65 anos) e doenças concomitantes. O aumento no uso de macrolídeos numa dada população está associado a uma maior prevalência de *S. pneumoniae* resistente a esta classe de antibióticos (Klugman e Lonks, 2005).

A resistência às quinolonas vem sendo relatada desde meados da década de 90. Já foram relatadas taxas de resistência à ofloxacina de até 22,3%, em Hong Kong (Jacobs *et al.*, 2003). O uso de fluoroquinolonas se correlaciona com o percentual de resistência à ciprofloxacina numa população, e o uso prévio de fluorquinolonas é fator de risco para seleção de cepas de *S. pneumoniae* e *Streptococcus* do grupo viridans resistentes (Chen *et al.*, 1999; de la Campa *et al.*, 2004). Cepas resistentes às quinolonas são mais prevalentes em faixas etárias mais avançadas (>65 anos), são isoladas mais freqüentemente de pacientes com doença não invasiva e geralmente expressam resistência também à penicilina e aos macrolídeos (Chen *et al.*, 1999; de la Campa *et al.*, 2004; Adam *et al.*, 2007). A resistência às fluorquinolonas ocorre primordialmente por mutações nos genes que codificam as subunidades da topoisomerase IV (*ParC* e *ParE*) e a DNA-girase (*GyrA*), enzimas que são os sítios de ação deste grupo de antimicrobianos. Um mecanismo adicional de resistência é a presença de uma bomba de efluxo da droga (Adam *et al.*, 2007). A transmissão horizontal de genes de resistência dos *Streptococcus* do grupo viridans parece ser uma importante fonte de aquisição de resistência de *S. pneumoniae* (de la Campa *et al.*, 2004). A resistência às quinolonas de 3ª geração (e.g. gatifloxacina, moxifloxacina) vem sendo igualmente reportada, porém com percentuais inferiores aos apresentados para ciprofloxacina. Um estudo realizado no Canadá mostrou uma taxa de resistência à ciprofloxacina de 4,2%,

enquanto a resistência às novas quinolonas foi de 1,0 a 1,6%, nas amostras isoladas em 2005 (Adam *et al.*, 2007). No entanto, taxas mais altas vêm sendo reportadas em Hong Kong, onde a resistência à levofloxacina ($MIC \geq 4$ mg/L) aumentou de 5,5%, em 1998, para 13,3%, em 2000 (Ho *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2001). Já foi reportada a falha clínica com levofloxacina em virtude do desenvolvimento de resistência durante o tratamento. Em muitos casos havia uma mutação inicial no gene *parC*, devido ao uso prévio de quinolona, antes do início do levofloxacina. O uso das novas quinolonas deve ser desencorajado em pacientes com história de uso prévio de quinolonas ou que apresentem resistência à ciprofloxacina (de la Campa *et al.*, 2004).

Um estudo realizado com 20.142 amostras de *S. pneumoniae*, isoladas de pacientes com infecção respiratória em 151 centros de 40 países dos 5 continentes, entre os anos de 2001 e 2004 mostrou que a resistência do agente aos β -lactâmicos e macrolídeos manteve-se estável no período, com uma taxa global em torno de 37% para ambas as classes de antimicrobianos. Foram observadas, no entanto, importantes diferenças regionais. A maior resistência à penicilina foi demonstrada na África do Sul, com 74% de resistência global (intermediária + alto grau), seguida pelo Extremo Oriente (China, Hong Kong, Japão, Coreia do Sul e Taiwan), com cerca de 63%, e Oriente Médio (Arábia Saudita e Israel), com 54%. A menor taxa de resistência foi registrada no Norte da Europa (Áustria, Bélgica, República Tcheca, Finlândia, Alemanha, Hungria, Irlanda, Holanda, Polônia, Rússia, República Eslovena, Suécia, Suíça e Reino Unido), com 13,3%. Já a resistência aos macrolídeos foi mais exuberante no Extremo Oriente (cerca de 80%), seguido pela África do Sul, com 54%, e Sul da Europa (Bulgária, França, Grécia, Itália, Portugal, Espanha e Turquia), com 37%. A resistência à levofloxacina e à telitromicina foi de

cerca de 1% e 0,2%, respectivamente (Felmingham *et al.*, 2007).

Felizmente, alguns estudos recentes têm reportado uma diminuição nas taxas de resistência de *S. pneumoniae* à penicilina e a outros antibióticos, como sulfametoxazol+trimetoprim e quinolonas, a partir do ano 2000 (Low, 2005). Tal decréscimo parece estar relacionado a uma diminuição das prescrições de antibióticos para infecções respiratórias da comunidade, o que foi registrado em países como os EUA, Canadá e Reino Unido. Outro fator que contribuiu para tal fenômeno foi a introdução da VCP7 (vide item 2.2.6.3). A resistência aos macrolídeos, no entanto, ainda apresenta tendência a aumentar (Low, 2005).

No Brasil vem sendo observado um aumento progressivo da resistência à penicilina ao longo dos últimos anos. Castanheira e cols. (2006), analisando majoritariamente amostras de *S. pneumoniae* isoladas de escarro de alta qualidade, encontraram um percentual de resistência de alto grau à penicilina que variou de 2,9%, em 1998, a 11%, em 2004, e foi maior no grupo com menos de 5 anos de idade. Nesse mesmo período, a resistência do pneumococo a outros antibióticos não beta-lactâmicos manteve-se estável (e.g. cotrimoxazol) ou diminuiu, como a observada aos macrolídeos, clindamicina e tetraciclina. A resistência às quinolonas respiratórias (levofloxacina, gatifloxacina) foi observada em apenas 0,2% das amostras de *S. pneumoniae*, enquanto que a resistência de alto grau às cefalosporinas de 3ª geração foi expressa por 0,5% dessas amostras. A sensibilidade do pneumococo à vancomicina foi de 100%. Os autores sugerem que a dissociação entre a resistência à penicilina e aos demais antibióticos não beta-lactâmicos observada no Brasil seria decorrente da maior diversidade de sorotipos resistentes à penicilina no nosso país, conforme observado em outros estudos. Isso contrasta com a realidade de outros países, onde o aumento da resistência à

penicilina se deveu, prioritariamente, à expansão de clones multirresistentes (Castanheira *et al.*, 2003; Castanheira *et al.*, 2006). Apesar dessa diversidade de sorotipos relacionados à resistência à penicilina, é importante destacar que a expansão dos clones Spain^{9V}-3 e Tennessee¹⁴-18, ambos expressando majoritariamente o sorotipo 14, contribuiu para o aumento da resistência de *S. pneumoniae* no Brasil (Brandileone *et al.*, 2006). Brandileone e cols. (2006), analisando 6.470 amostras invasivas de *S. pneumoniae*, das quais 69,3% foram isoladas de pacientes com meningite, mostraram um aumento significativo de resistência à penicilina entre 1993 e 2004. A resistência intermediária à penicilina foi de 9,1% em 1993, manteve-se relativamente estável até 2000, aumentando progressivamente a partir de então até o valor de 22,0%, em 2004. Já a resistência de alto grau variou de 0,3%, em 1994, a 7,2%, em 2003. Em 2004 a resistência de alto grau à penicilina foi de 5,9%. A resistência esteve associada à idade menor que 5 anos, ao diagnóstico de pneumonia e aos sorotipos 14, 6B, 23F, 19A, 19F, 23B, 6A e 9V. A resistência intermediária às cefalosporinas de 3ª geração (CIM 1 µg/ml) foi de 2,4% no período (média nacional) entre as cepas isoladas de pacientes com meningite. Todas as cepas resistentes às cefalosporinas de 3ª geração também o foram à penicilina. Entre 2000 e 2004, 65% das amostras de *S. pneumoniae* foram resistentes ao cotrimoxazol, 14,6% à tetraciclina, 6,2% à eritromicina, 1,3% ao cloranfenicol e 0,7% à rifampicina. O percentual de resistência a estes antibióticos manteve-se estável no período. O percentual de amostras com resistência a 3 ou mais classes de antibióticos foi de 4,6%. Não foram encontradas cepas resistentes ao levofloxacino e à vancomicina neste estudo (Brandileone *et al.*, 2006). A prevalência de *S. pneumoniae* resistente à penicilina varia de forma expressiva entre as diferentes regiões do país. No estudo de Brandileone e cols. (2006) o maior

percentual de cepas exibindo resistência à penicilina foi encontrado na região Sudeste (intermediária 20,4%; de alto grau 7,7%), seguido pelo observado na região Sul (intermediária 22,5% e de alto grau 5,2%). Na região Centro-oeste, esses percentuais foram de 18,8% (resistência intermediária) e 1,7% (resistência de alto grau), enquanto no Nordeste os valores foram 15,4% e 0,7%, respectivamente. Na região Norte, apenas 7,9% das cepas de *S. pneumoniae* isoladas exibiam resistência intermediária. Não foi encontrada resistência de alto grau nessa região. Os autores concluem que os menores valores de resistência encontrados na região Centro-oeste, Norte e Nordeste provavelmente refletem menor acesso à assistência à saúde e menor uso de antibióticos pela população, o que por sua vez tem relação com o menor desenvolvimento sócio-econômico dessas regiões (Brandileone *et al.*, 2006). Outros estudos, no entanto, demonstram diferentes taxas de resistência de *S. pneumoniae* à penicilina nas diversas regiões brasileiras. Um estudo realizado em Brasília-DF entre 1995 e 2004, com amostras de *S. pneumoniae* isoladas de LCR, mostrou um aumento do percentual de resistência intermediária, de 15,2%, no biênio 1995-1996, para 38,9%, no biênio 2003-2004. A resistência de alto grau, no entanto, não foi encontrada nesse estudo (Vieira *et al.*, 2007). Já o estudo de Mantese e cols. (2003) realizado em Uberlândia-MG com 148 amostras de *S. pneumoniae* isolados de sítios estéreis entre 1999 e 2003, a maioria de pacientes com diagnóstico de pneumonia (61,4%) e meningite (21,6%), mostrou um percentual de resistência intermediária e de alto grau à penicilina de 12,8% e 2,7%, respectivamente (Mantese *et al.*, 2003). Nascimento-Carvalho e cols. (2003), em Salvador-BA, encontraram 18,6% de resistência intermediária e 1,4% de resistência total em 70 amostras de *S. pneumoniae* obtidas majoritariamente de pacientes com diagnóstico de pneumonia entre 1997 e 2002 (Nascimento-Carvalho *et al.*, 2003). Os resultados divergentes

entre esses estudos podem ser devidos a diferenças locais dentro de cada região brasileira, à mudança na prevalência de resistência num mesmo local ao longo do tempo, ao uso de diferentes metodologias para realização do teste de sensibilidade, além de diferenças na composição das amostras analisadas quanto à procedência (sítio estéril ou não) e características demográficas da população fonte (idade, densidade de uso de antibiótico).

O impacto clínico da resistência do pneumococo à penicilina e às cefalosporinas varia de acordo com a localização do processo infeccioso. Os pontos de corte de CIM de penicilina, estabelecidos nos anos 70, são altamente preditivos do desfecho clínico das meningites pneumocócicas. No entanto, a maioria dos estudos não demonstrou relação entre resistência *in vitro* à penicilina e falha terapêutica quando amoxicilina em altas doses, penicilina ou cefalosporinas de 3ª geração são utilizados para o tratamento de pneumonia pneumocócica, desde que a CIM seja $\leq 4\mu\text{g/ml}$ (Bishai, 2002; Klugman, 2002). Tal observação levou alguns autores a sugerir valores de CIM de penicilina diferentes daqueles então recomendados pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais dos EUA (CLSI, do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*, antigo NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) para *S. pneumoniae* isolados de pacientes com pneumonia: CIM $\leq 1\mu\text{g/ml}$ – sensível; CIM $2\mu\text{g/ml}$ – intermediário e CIM $\geq 4\mu\text{g/ml}$ – resistente (Heffelfinger *et al.*, 2000).

Em virtude da penetração pouco eficaz da penicilina pela BHE, o tratamento de meningite provocada por cepas exibindo resistência intermediária à penicilina deve ser feito com cefalosporinas de 3ª geração, pois tais antibióticos apresentam excelente penetração pela BHE e boa atividade contra *S. pneumoniae* de resistência intermediária. Já o tratamento de cepas demonstrando resistência de alto grau à

penicilina ou de grau intermediário (CIM 1µg/ml) às cefalosporinas deve ser feito com a associação de vancomicina com uma cefalosporina de 3ª geração. Tal associação se justifica pelo efeito sinérgico observado *in vitro* e pela penetração subótima da vancomicina pela BHE, especialmente quando é feita a administração concomitante de dexametasona (Crook e Spratt, 1998; Begg *et al.*, 1999; Tunkel *et al.*, 2004). O benefício desta associação de antimicrobianos no tratamento da meningite causada por cepas altamente resistentes às cefalosporinas (CIM para cefotaxima $\geq 16\mu\text{g/ml}$) não é tão claro (Crook e Spratt, 1998). A associação da rifampicina a tais esquemas pode se mostrar benéfica, sendo recomendada por alguns autores em caso de isolamento de bactérias resistentes a beta-lactâmicos ou em casos de falha terapêutica do esquema duplo (Crook e Spratt, 1998).

2.2.6.4 Impacto das vacinas antipneumocócicas

A doença pneumocócica é responsável por mais óbitos do que qualquer outra doença imuno-previnível (Nuorti *et al.*, 1998). Existem dois tipos de vacina antipneumocócica: a polissacarídica e a conjugada. A vacina polissacarídica é composta pelo polissacarídeo capsular dos 23 sorotipos mais prevalentes de *S. pneumoniae* (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F). Estes sorotipos são responsáveis por 85 a 90% dos casos de DPI nos EUA. Está indicada para pessoas entre 2 e 64 anos de idade com fatores de risco (*e.g.* doença cardiovascular crônica, DPOC, diabetes melito, doença hepática, imunodeficiência, asplenia anatômica ou funcional) para DPI e pessoas com mais de 65 anos. Os antígenos polissacarídicos estimulam a produção de anticorpos por linfócitos B, porém não são capazes de estimular uma resposta

humoral dependente de células T. Crianças abaixo de 2 anos possuem linfócitos B relativamente imaturos. Conseqüentemente, a vacina polissacarídica não produz imunidade significativa, não sendo, portanto, indicada para essa faixa etária. Neste grupo são utilizadas as vacinas conjugadas, das quais a única licenciada é a VCP7. Essa vacina, formada por polissacarídeos capsulares dos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugados a uma proteína (toxóide diftérico modificado), promove uma resposta imune dependente de células T, necessária para otimizar a produção de anticorpos e para montar uma resposta anamnésica via memória imunológica. Os sorotipos contemplados pela VCP7 são responsáveis por mais de 80% das DPI entre as crianças estadunidenses, e são os mais associados à resistência à penicilina (Whitney *et al.*, 2003; Byington *et al.*, 2005; Hausdorff *et al.*, 2005; Winn Jr., 2006; CDC, 2007). A vacina conjugada mostrou-se capaz de diminuir a infecção e a colonização pelos sorotipos contemplados. A diminuição da colonização é responsável pelo efeito de imunidade coletiva (*herd immunity*). Após a vacinação com a VCP7 ocorre uma rápida e consistente substituição dos sorotipos vacinais por sorotipos não vacinais na colonização da nasofaringe. Já a vacina polissacarídica não apresenta impacto sobre a colonização (Dagan *et al.*, 1996; CDC, 2005; Hausdorff *et al.*, 2005). Nos países onde foi adotada a vacinação em massa da população abaixo de 2 anos com a VCP7, foi observada uma diminuição na incidência de DPI (Kaplan *et al.*, 2004; Byington *et al.*, 2005; Kyaw *et al.*, 2006; Messina *et al.*, 2007). Essa diminuição foi mais exuberante entre as crianças abaixo de 2 anos, onde a incidência de DPI diminuiu em 69% cerca de um ano após o licenciamento da vacina, nos EUA. Foi observada também uma diminuição, ainda que mais discreta, na incidência da doença entre os adultos, o que provavelmente se deveu à diminuição no percentual de crianças colonizadas (Whitney *et al.*, 2003). O

percentual de DPI provocada por cepas resistentes aos antimicrobianos diminuiu após a introdução da vacina, inclusive entre os adultos, segundo alguns estudos (Kaplan *et al.*, 2004; Byington *et al.*, 2005; Kyaw *et al.*, 2006). No entanto, foi observado um aumento no número de casos de DPI por sorotipos não contemplados pela VCP7, como os 15, 19A e 33. Tal aumento parece se dever predominantemente à expansão de clones que não expressam sorotipos vacinais já presentes antes da introdução da VCP7, embora uma parte do fenômeno também possa ser atribuída à emergência de novos clones e à troca de cápsula entre clones usualmente associados aos sorotipos vacinais e os não vacinais (Kaplan *et al.*, 2004; Byington *et al.*, 2005; Beall *et al.*, 2006; Messina *et al.*, 2007). Um estudo mostrou que as crianças com DPI por sorogrupos de *S. pneumoniae* não vacinais eram mais velhas, tinham maior probabilidade de ter empiema parapneumônico e permaneceram internadas por mais tempo (Byington *et al.*, 2005). A introdução da VCP7 também provocou alterações semelhantes na epidemiologia da doença pneumocócica entre os pacientes adultos com Aids nos EUA, com diminuição global da incidência de DPI às custas de uma diminuição da incidência dos sorotipos contemplados pela vacina, porém com aumento da DPI provocada pelos sorotipos não vacinais (Flannery *et al.*, 2006). O aumento na incidência de DPI causada por sorotipos não vacinais provocou um pequeno aumento no número total de casos de doença invasiva, após um nadir observado nos primeiros anos após a introdução da vacina, num estudo realizado no Texas, EUA (Messina *et al.*, 2007). Foi observado também um aumento no percentual de resistência antimicrobiana entre os sorotipos não vacinais emergentes (Kaplan *et al.*, 2004; Beall *et al.*, 2006; Kyaw *et al.*, 2006; Messina *et al.*, 2007).

A distribuição dos sorotipos varia muito entre os países. Estudos da Europa,

América Latina, Israel e Austrália mostram que nestas localidades os sorotipos contidos na VCP7 foram responsáveis por uma parcela das DPI bem menor do que nos Estados Unidos (Byington *et al.*, 2005). Em países da África, como Burkina Faso e Malawi, a VCP7 apresenta uma cobertura muito baixa, já que os sorotipos que a compõem perfazem apenas 8 e 41% dos sorotipos isolados, respectivamente (Gordon *et al.*, 2003; Yaro *et al.*, 2006). Um dos motivos para tal achado é a alta prevalência dos sorotipos 1 e 5 nestas localidades. A vacina conjugada pneumocócica nonavalente (VCP9), ainda não licenciada, contempla, além dos sorotipos presentes na VCP7, os sorotipos 1 e 5, e foi testada com sucesso na África. Esta vacina foi capaz de prevenir doença invasiva e pneumonia confirmada por radiografia, além de diminuir a taxa de mortalidade global, na Gâmbia, e de doença por cepas resistentes a antibióticos, na África do Sul (Klugman *et al.*, 2003; Cutts *et al.*, 2005). O uso da VCP9 conferiria proteção contra 58% e 66% dos isolados em Burkina Faso e Malawi, respectivamente. Isso ilustra a necessidade de se conhecer os sorotipos mais prevalentes de *S. pneumoniae* causadores de doença invasiva antes de se planejar estratégias vacinais para uma dada região.

Estão ainda em desenvolvimento as vacinas 11 (VCP11) e 13-valente (VCP13). A VCP11 contempla, além dos sorotipos da VCP9, os sorotipos 7F e 3, enquanto a VCP13 contempla, além dos sorotipos da VCP11, os sorotipos 6A e 19A. Num estudo realizado com crianças tailandesas, a cobertura conferida pelas vacinas VCP7, VCP9, VCP11 e VCP13 foi de 69,0%, 73,8%, 73,8% e 85,7% das amostras de *S. pneumoniae* isoladas de crianças com menos de 2 anos de idade com DPI (Phongsamart *et al.*, 2007). Os sorotipos presentes nas vacinas VCP7, VCP9 e VCP11 correspondem a 65%, 77% e 83%, respectivamente, dos sorotipos isolados de DPI em crianças menores de 6 anos na América Latina. Esses valores foram

calculados com dados de vigilância de DPI de seis países: Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México e Uruguai (Garcia *et al.*, 2006).

No Brasil, um estudo realizado com dados de mais de 20 anos de vigilância nacional mostrou que os sorotipos mais freqüentemente isolados foram, em ordem decrescente: 14, 1, 6B, 5, 18C, 6A 3, 23F, 19F, 9V, 4, 19A e 10A. Esses sorotipos foram responsáveis por 74,4% dos casos de DPI, de um total de 4.858 amostras isoladas entre 1977 e 2000. O percentual de cepas que expressam sorotipos incluídos na VCP7 e na VCP9 foi de 58,2 e 73%, entre os isolados de doença invasiva em crianças menores de 5 anos (Brandileone *et al.*, 2003). Já num estudo realizado em Salvador-BA, a cobertura estimada da VCP7 foi de 74%, entre os pacientes com meningite pneumocócica abaixo de 5 anos de idade, e de 94% dentre aqueles infectados por cepas resistentes à penicilina. Tal resultado se deveu principalmente à baixa prevalência dos sorotipos 1 e 5 dentre as 291 amostras avaliadas, sugerindo a existência de diferenças regionais na distribuição de sorotipos no Brasil (Reis *et al.*, 2002). A VCP7 já foi licenciada no Brasil, porém ainda não faz parte do programa nacional de imunização (Brandileone *et al.*, 2006).

2.3 A Reação da Polimerase em Cadeia

A PCR é uma técnica de biologia molecular cujo princípio é a amplificação de uma seqüência ácido nucléico alvo. É realizada através de uma reação química simples, baseada na ação de uma polimerase que permite iniciar a replicação da seqüência alvo de DNA sob altas temperaturas (*e.g.* *taq* polimerase). Na sua forma mais simples (PCR convencional), a reação envolve o DNA alvo contido no espécime clínico, um par (verso e reverso) de iniciadores de oligonucleotídeos

(*primers*), a polimerase termoestável, uma mistura equimolar de trifosfato de deoxiribonucleotídeos (dNTP: dATP, dCTP, dGTP e dTTP), $MgCl_2$ e uma solução tampão. Os dois iniciadores flanqueiam a seqüência de DNA de dupla fita a ser amplificada, e são complementares a fitas opostas do DNA alvo. A reação ocorre num aparelho denominado termociclador, onde se sucedem os ciclos, cujas etapas têm sua temperatura e duração previamente determinadas e programadas por computador. Inicialmente a mistura é aquecida, para que ocorra a separação das duas fitas do DNA alvo, e em seguida sofre um resfriamento, para permitir o anelamento dos iniciadores de forma específica. A mistura é então novamente aquecida até a temperatura ideal para o funcionamento da polimerase termoestável, permitindo a síntese de DNA a partir da extremidade 3' dos iniciadores. Após esta etapa, o ciclo se reinicia, e ao final de 30 ciclos são obtidos, teoricamente, cerca de 10^9 produtos de amplificação. Essas seqüências de DNA de dupla fita, de peso molecular conhecido e proporcional ao número de pares de bases, podem então ser visualizadas sob luz fluorescente, após uma corrida eletroforética num gel de agarose padrão seguida da coloração por brometo de etídio (Nolte, 2003). Na prática, a quantidade de produto de amplificação obtida pode ser bem menor, em virtude da presença de inibidores da reação (*e.g.* composto heme, imunoglobulinas) ou por dificuldade em otimizar as condições da reação (Akane *et al.*, 1994; Al-Soud *et al.*, 2000; Nolte, 2003).

Além da PCR convencional existem várias técnicas baseadas no mesmo princípio. A PCR quantitativa, na sua abordagem competitiva, utiliza um molde de DNA semelhante ao DNA alvo, amplificado pelos mesmos iniciadores e em uma quantidade predefinida, denominado competidor. Ao final da reação a quantidade dos produtos de amplificação do DNA alvo e do competidor são correlacionados,

permitindo a determinação da quantidade de DNA alvo presente inicialmente no espécime. No ensaio do tipo PCR aninhada (*nested PCR*) são utilizados dois pares distintos de iniciadores e duas etapas de amplificação. Na primeira etapa é amplificado um trecho do DNA alvo pelo primeiro par de iniciadores. Os produtos de amplificação são então submetidos à segunda etapa, quando é utilizado o segundo par de iniciadores para a amplificação de uma seqüência de DNA menor, contida na seqüência inicialmente amplificada. Tal abordagem costuma apresentar maior sensibilidade e especificidade, embora aumente o tempo necessário para a reação e acarrete maior risco de contaminação. Já a PCR multiplex utiliza mais de um par de iniciadores para pesquisar a presença de seqüências de DNA alvo de diferentes patógenos num mesmo espécime, simultaneamente (Nolte, 2003).

Além da coloração pelo brometo de etídio, existem diversos outros métodos de detecção e análise dos produtos de amplificação após a eletroforese em gel de agarose. Após a transferência dos produtos para uma membrana de nitrocelulose ou *nylon* pode ser realizada a hibridização com sondas específicas e marcadas com radionuclídeos ou marcadores enzimáticos. A leitura se dá através da medição da emissão de radioatividade, no primeiro caso, ou da luz ou cor, após adição de um substrato quimioluminescente ou colorimétrico, no segundo. Tal abordagem aumenta tanto a especificidade quanto a sensibilidade do método. Os produtos podem ainda ser analisados pelo padrão de bandas eletroforéticas após digestão por uma enzima de restrição ou pelo seqüenciamento, entre outras técnicas. Já os métodos automatizados de detecção dos produtos de amplificação utilizam sistemas de placas colorimétricas microtituladas, ao invés da eletroforese em gel. Nestes ensaios, o produto de amplificação é capturado num poço de uma placa por uma sonda de oligonucleotídeos específica que reveste a superfície interna do poço. A

detecção se dá pela mudança de cor decorrente da adição de um conjugado enzimático e seu substrato específico (PCR-EIA, do inglês *polymerase chain reaction–enzyme immunoassay*). Tais métodos são rápidos e permitem a testagem de um grande número de espécimes simultaneamente, muitos deles já sendo comercialmente disponíveis. A técnica da PCR em tempo real (RT-PCR) exige um termociclador especial, no qual existem ópticas de precisão que captam a emissão de fluorescência diretamente no poço onde ocorre a reação. Para isso, são utilizados corantes fluorescentes que se ligam preferencialmente a fitas duplas de DNA, corando, portanto, os produtos de amplificação. Desse modo, a amplificação, detecção e quantificação do material genético presente no espécime clínico são feitas de forma simultânea. A especificidade desse método pode ser otimizada pela inclusão de sondas de hibridização na mistura. A RT-PCR diminui o tempo necessário para a realização do ensaio; já foi relatada a detecção de DNA de Hib a partir de um espécime de LCR em apenas 15 minutos. Além disso, ela minimiza o risco de contaminação do laboratório com os produtos de amplificação, já que todo o processo ocorre num único tubo fechado, e propicia uma quantificação mais precisa da quantidade de DNA presente no espécime, já que essa quantificação é feita desde o início da amplificação (Nolte, 2003; Uzuka *et al.*, 2004).

O ensaio da PCR, assim como os demais métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos, apresenta como vantagem a maior sensibilidade intrínseca, por permitir a detecção de organismos em pequeno número e também daqueles não cultiváveis, de crescimento lento ou de difícil cultivo. Por serem métodos de biologia molecular, são capazes de detectar microorganismos mesmo após a sua morte por meios físicos ou químicos (*e.g.* uso de antimicrobianos). No entanto, tais técnicas estão sujeitas a problemas que podem levar a resultados

falsamente positivos ou negativos. Os resultados falso-positivos surgem, principalmente, devido à contaminação da área de trabalho com produtos da amplificação. Este problema é contornado pela separação das áreas de trabalho, pipetas e reagentes dos diversos componentes da reação, assim como pela adoção de técnicas que impedem a amplificação subsequente dos produtos (Gill, 2005). Outra causa de resultado falso positivo é amplificação não específica, além da possível presença de DNA bacteriano nos tecidos humanos normais (Baron, 2006). A utilização de ponteiros com barreira e a adoção de boas práticas de laboratório contornam este problema facilmente detectável, pois toda a reação inclui um controle positivo e outro negativo. Já os resultados falso-negativos ocorrem pela presença de inibidores da reação no espécime clínico, no meio de transporte do espécime ou em materiais, como *swabs* com alginato de cálcio. São causas ainda de resultados falso negativos o uso de espécimes clínicos não validados para determinada técnica, problemas nas condições de transporte e armazenamento dos espécimes clínicos (degradação do DNA), baixa concentração do agente infeccioso, variabilidade do gene amplificado, entre outras (Radstrom *et al.*, 1994; Gill, 2005; Baron, 2006).

As técnicas de biologia molecular baseadas na amplificação de ácidos nucléicos, de um modo geral, e as da PCR, em particular, vêm sendo utilizadas na prática clínica para diagnóstico e seguimento de diversas doenças, como a infecção crônica pelo HIV e pelo vírus da hepatite C (Nolte, 2003). No entanto, o espectro de testes deste tipo já validados para doenças bacterianas é estreito, e a execução destes ensaios, apesar de simples, exige pessoal treinado e capacitado (Gill, 2005). Para um grande número de agentes patogênicos, estudos com métodos baseados em amplificação de ácidos nucléicos devem ser realizados em diferentes

populações, seus resultados devem ser comparados com os de outros métodos tradicionais e sua utilidade clínica necessita ser avaliada. Para que ocorra, portanto, a transição entre o uso experimental de tais técnicas e seu uso na prática clínica, são necessárias regulamentações padronizadas, como as fornecidas pelo CLSI, assim como os estudos de validação realizados tanto por empresas fornecedoras de testes comerciais como por pesquisadores que desenvolvem ensaios *in house* (Gill, 2005).

2.4 Validação dos testes diagnósticos

A validação de novos testes diagnósticos é feita, inicialmente, pela determinação da sensibilidade e especificidade, calculadas a partir dos resultados do teste em pessoas doentes e não doentes, organizados na clássica tabela 2x2 (Tabela 1). A sensibilidade é definida como a capacidade de um exame detectar a doença quando ela está de fato presente. É calculada através da aplicação do teste em pacientes sabidamente acometidos pela doença em questão, sendo determinada pela fórmula $a/a+c$, onde a é o número de doentes com o teste positivo e $a+c$ é o número total de doentes. Já a especificidade avalia a capacidade de um determinado teste afastar a doença quando esta está ausente. É calculada pela aplicação do teste em pessoas sabidamente sem a doença em questão, sendo representada pela fórmula $d/b+d$, onde d é o número de não-doentes cujo exame foi negativo e $b+d$ é o total de pessoas sem a doença (Medronho, 2003). Outros parâmetros úteis na avaliação do desempenho de um novo método diagnóstico numa população é a determinação dos valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN). O VPP é o percentual de pessoas doentes entre todas aquelas nas quais o

teste foi positivo, e é definido pela fórmula $a/a+b$. Representa, portanto, a probabilidade de um teste positivo significar presença de doença. Já o VPN é o percentual de pessoas sãs dentre aquelas nas quais o exame foi negativo, e é definido pela fórmula $d/c+d$. Analogamente, o VPN expressa a probabilidade de um teste negativo indicar ausência de doença. Ao contrário da sensibilidade e especificidade, os VPP e VPN estão diretamente relacionados à prevalência da doença na população estudada.

Tabela 1 Relação entre os resultados de um teste e a presença/ausência de doença para determinação de sensibilidade e especificidade de um método diagnóstico.

	Doentes	Não doentes
Teste positivo	a	b
Teste negativo	c	d

A definição dos doentes e não-doentes se dá pelo resultado positivo ou negativo de um teste considerado o mais fidedigno existente (padrão ouro), aplicado a uma dada população. De acordo com o resultado do padrão ouro, portanto, é definida a prevalência da doença naquela população, representada pela fórmula $a+c/a+b+c+d$. A determinação do desempenho do método novo é feita, conseqüentemente, pela comparação com o desempenho do padrão ouro. No entanto, quando se trata de comparar um teste novo, mais sensível, com um antigo, de menor sensibilidade, pode ser gerado um paradoxo, no qual os resultados positivos do teste novo seriam julgados como falso positivos, afetando a especificidade do método avaliado (Fletcher, 1996). Este problema é freqüente quando se trata de validar os métodos moleculares, como os baseados na reação da

polimerase em cadeia, já que tais métodos são geralmente mais sensíveis do que os métodos microbiológicos e imunológicos tradicionais (Baron, 2006).

A validação de métodos diagnósticos moleculares, pela mensuração de sua acurácia, utilidade clínica e reprodutibilidade, é um desafio. Para que se faça a validação dos métodos moleculares é necessário, de um modo geral, adotar como padrão ouro diferentes combinações de critérios clínico-laboratoriais, alvos moleculares alternativos ou técnicas por demais invasivas, como biópsia. Outra estratégia que pode ser utilizada para estimar a sensibilidade é aplicar os diferentes testes a espécimes clínicos semeados com quantidades pré-definidas do agente infeccioso a ser pesquisado, de modo a estipular o limiar de detecção de cada um dos testes (Baron, 2006).

No caso das meningites bacterianas, o padrão ouro tradicional é a cultura de LCR. Tal padrão apresenta como limitação a importante diminuição na capacidade de isolamento dos principais agentes causadores de MBA quando o LCR é obtido após o início de antibióticos ou é coletado ou transportado de forma inadequada, o que afeta a sua sensibilidade (Bell e McCormick, 1981; Thomson e Bertram, 2001). Dessa maneira, a cultura é utilizada como padrão ouro para a definição de doente quando positiva para o agente etiológico em questão, e para definição de não doente quando positiva para outro patógeno, já que o resultado negativo da cultura não descarta a possibilidade de MBA. Tal conduta exclui da análise do novo método diagnóstico uma expressiva parcela da população com MBA, isto é, aquela na qual a cultura é negativa. Isso tende a superestimar o desempenho do novo método diagnóstico, além de refletir um cenário muito diferente daquele no qual um novo teste deverá ser mais útil, ou seja, na situação em que o status de doença não é tão claramente definido (Fletcher, 1996; Tarafdar *et al.*, 2001). Além disso, essa

abordagem, na qual a sensibilidade e a especificidade na verdade estão sendo avaliadas em duas populações distintas, torna impossível a determinação dos valores preditivos positivo e negativo do teste, já que não podemos definir a prevalência da doença. Uma outra desvantagem é que, ao se utilizar a cultura como padrão ouro, a comparação da sensibilidade do novo método com a da cultura se torna tecnicamente inviável.

Na literatura, a maioria dos estudos que buscam validar métodos moleculares para o diagnóstico de MBA tem recorrido a duas estratégias para contornar esse problema: a definição da sensibilidade analítica e o uso de critérios clínicos e laboratoriais combinados para a definição de critério de caso.

Sensibilidade analítica é uma forma de se medir a sensibilidade dos ensaios baseados em PCR de forma quantitativa, pela realização dos testes com suspensões de bactérias em concentrações pré-definidas, de modo a determinar o limiar de detecção da técnica. Isso permite realizar comparações objetivas com outros métodos, ainda que teóricas, já que se trata de uma avaliação *in vitro*. Para minimizar esse viés, costuma-se utilizar como diluente alíquotas de espécime clínico estéril, (e.g. LCR) para tentar reproduzir da melhor maneira possível as condições encontradas *in vivo* (Cherian *et al.*, 1998; Rintamaki *et al.*, 2002; van Haeften *et al.*, 2003).

Critérios para definição de caso de MBA compostos por dados clínicos e laboratoriais são utilizados tanto por guias de vigilância epidemiológica quanto por artigos destinados a validação de métodos diagnósticos e determinação de fatores prognósticos (Miner *et al.*, 2001; WHO, 2003; Brasil, 2005a; Kennedy *et al.*, 2007; Mani *et al.*, 2007; Van Gastel *et al.*, 2007; Welinder-Olsson *et al.*, 2007). Não existe uma padronização desses critérios. Muitos artigos utilizam a presença de quadro

clínico sugestivo, nem sempre especificada, aliada à presença de pleocitose neutrofilica, geralmente acima de 100 neutrófilos/ mm^3 (Durand *et al.*, 1993; Miner *et al.*, 2001). Outros consideram ainda a presença de alterações bioquímicas (glicorraquia baixa e proteinorraquia elevada), como é o caso do trabalho de Tarafdar e cols. (2001). Este estudo, destinado a avaliar o papel do látex no diagnóstico das MBA, utiliza como critério de caso parâmetros definidos por Spanos e cols. (1989): glicose <34 mg/dl, proteína >220 mg/dl, leucócitos >2000 / mm^3 , neutrófilos >1180 / mm^3 ou relação glicose no LCR/sangue $<0,23$. Segundo estes autores, a presença de qualquer um desses critérios é capaz de indicar a natureza bacteriana da meningite com alto grau de certeza ($\geq 99\%$), embora sua ausência não tenha a mesma acurácia em descartar o diagnóstico de MBA (Spanos *et al.*, 1989). Já a OMS, no seu protocolo de vigilância de doenças imuno-previníveis, considera caso de MBA provável aquele caso suspeito (definido pela presença de temperatura axilar $>38^\circ\text{C}$ associada a sinais de irritação meníngea ou alteração do nível de consciência) no qual pelo menos uma das alterações esteja presente no LCR: (i) aspecto turvo; (ii) leucometria >100 células/ mm^3 ; (iii) leucometria entre 10 - 100 células/ mm^3 e proteinorraquia >100 mg/dl ou glicorraquia <40 mg/dl (WHO, 2003). No entanto, a completa diferenciação entre MBA e outros processos inflamatórios meníngeos, especialmente a meningite viral, apenas com base em quadro clínico e resultados de exames inespecíficos, é impraticável, já que ocorre uma certa superposição da expressão clínica e laboratorial destas entidades nosológicas, especialmente quando é iniciada antibioticoterapia precoce e empiricamente, o que modifica tanto a evolução clínica quanto os parâmetros laboratoriais das MBA (Dalton e Allison, 1968; Gray e Fedorko, 1992; Tunkel, 2005a). Assim sendo, a adoção de tais critérios leva invariavelmente à exclusão de pacientes que realmente

apresentam MBA e à inclusão de pacientes que não apresentam o diagnóstico.

A positividade de qualquer um dos métodos diagnósticos clássicos em espécimes de pacientes com suspeita de meningite, associada ou não a resultados de exames inespecíficos no LCR, é também utilizada como critério para definição de caso de MBA por diversos autores (Radstrom *et al.*, 1994; Cherian *et al.*, 1998; van Haeften *et al.*, 2003; WHO, 2003; Brasil, 2005a; Mani *et al.*, 2007; Welinder-Olsson *et al.*, 2007). É o caso da OMS, que define caso de MBA comprovada como qualquer paciente que apresente quadro clínico sugestivo de MBA e apresente um dos seguintes achados na análise do LCR: identificação pelo látex ou bacterioscopia (diplococos gram-negativos - DGN, DGP ou coco-bacilos gram-negativos) ou crescimento na cultura de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, respectivamente (WHO, 2003).

O uso de critérios de definição de caso compostos por dados clínicos e resultados de diferentes exames laboratoriais torna possível a comparação da sensibilidade do método em avaliação com o percentual de positividade dos outros métodos, teoricamente menos sensíveis. Além dessa vantagem, essa abordagem amplia o espectro de pacientes nos quais são testados os métodos. Essa ampliação minimiza o viés que é introduzido quando o desempenho de um teste é avaliado apenas em pessoas obviamente doentes (*e.g.* com cultura positiva no LCR, o padrão ouro tradicional das MBA) e outras obviamente não doentes (*e.g.* com cultura positiva para outro patógeno), o que, de um modo geral, tende a superestimar o teste a ser avaliado (Fletcher, 1996; Tarafdar *et al.*, 2001). Tais benefícios devem ser balanceados com o risco de se ampliar muito a definição de caso, adotando, portanto, um critério de baixa especificidade. Nessa situação, pacientes com doenças que produzem quadros clínicos semelhantes seriam considerados casos da

doença de interesse, aumentando o número de falsos negativos dos métodos diagnósticos utilizados (Fletcher, 1996).

Uma outra forma de avaliar a utilidade clínica dos diferentes métodos diagnósticos para determinação da etiologia das MBA é pela medida da contribuição de cada um deles na confirmação do diagnóstico. Isso é feito pela avaliação do número de casos diagnosticados por cada método, individualmente, e por diferentes combinações deles. No caso das MBA, onde a realização do Gram e da cultura são inquestionáveis, devido a rapidez e baixo custo do primeiro e a habilidade única do segundo em disponibilizar a bactéria causadora da doença para estudos subsequentes, geralmente essa abordagem procura avaliar o impacto adicional conferido pela realização de outros testes, considerados mais sensíveis e habitualmente mais caros do que os dois primeiros. Se encaixam nesse perfil tanto os testes de pesquisa de antígeno por métodos imunológicos (*e.g.* látex) quanto os baseados em biologia molecular (*e.g.* PCR) (Chanteau *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2007; Van Gastel *et al.*, 2007).

3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista os seguintes fatores: (1) a relevância epidemiológica das MBA; (2) a importância da definição da etiologia das MBA; (3) o fato de *S. pneumoniae* ser a 2ª maior causa de MBA no Brasil, e a que apresenta maior morbiletalidade; (4) a dificuldade de estabelecimento da etiologia das MBA pelo emprego dos métodos de Gram, cultura e pesquisa de antígeno pela aglutinação de partículas de látex; (5) as evidências na literatura das vantagens da PCR no diagnóstico etiológico das MBA; (6) os relatos na literatura de sucesso com o uso da PCR para amplificação do gene da pneumolisina no diagnóstico de diferentes manifestações da doença pneumocócica, incluindo meningite; e considerando ainda a disponibilidade de uma coleção de LCR de pacientes com meningite pneumocócica confirmada, propusemos o presente estudo. Nosso intuito foi validar um ensaio de PCR para diagnóstico de meningite pneumocócica e, deste modo, contribuir para a solução das atuais deficiências no diagnóstico das MBA no Estado do Rio de Janeiro.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral validar um ensaio da PCR convencional para o diagnóstico da meningite pneumocócica na população do Estado do Rio de Janeiro.

4.2 Objetivos específicos

- Calcular os valores de eficiência da performance da PCR para a detecção do gene da pneumolisina (*ply*), em comparação com os resultados da cultura, da bacterioscopia e do teste do látex, no diagnóstico da meningite pneumocócica.
- Descrever a positividade da PCR *ply* em relação ao tempo entre o início da antibioticoterapia para tratamento da meningite pneumocócica e a coleta do LCR.

5 METODOLOGIA

5.1 Local, desenho do estudo e definição de caso

Este estudo foi realizado no Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e no Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião (IEISS), na cidade do Rio de Janeiro. Trata-se de um estudo retrospectivo de validação de um método baseado na PCR para o diagnóstico de meningite pneumocócica. Nós avaliamos um ensaio da PCR convencional para detecção de *S. pneumoniae* em espécimes de LCR de pacientes submetidos a punção lombar pela indicação do médico assistente, e encaminhados ao Laboratório Estadual de Referência para Meningites, localizado no IEISS. Naquele laboratório são processados os espécimes de LCR dos pacientes atendidos no próprio IEISS, assim como os de pacientes atendidos em outras unidades do Estado que não possuam laboratório próprio capacitado para a análise citológica, bioquímica e/ou microbiológica desses espécimes. O transporte dos espécimes dos outros hospitais até o Laboratório de Referência raramente é feito em condições adequadas para a realização da técnica da PCR (a 4°C ou em gelo reciclável), já que a recomendação da SESRJ é o encaminhamento dos espécimes em frascos estéreis em temperatura ambiente, o mais breve possível. No entanto, freqüentemente os espécimes de LCR chegam ao laboratório mais de 24h após a realização da punção lombar. Portanto, um ensaio da PCR deve funcionar satisfatoriamente mesmo na ausência de condições ideais de armazenagem e transporte para que seja adotado como método diagnóstico naquele laboratório. Vale lembrar que muitos dos hospitais que encaminham espécimes de LCR ao IEISS

utilizam o chamado "*kit* meningite", distribuído pela SESRJ. Esse *kit* consiste em um frasco de hemocultura, duas lâminas para microscopia, um tubo com agar chocolate inclinado, dois tubos estéreis e vazios. A orientação da SESRJ é que no hospital de origem seja semeado o LCR no tubo com agar chocolate, semeado o frasco de hemocultura, realizado o esfregaço nas lâminas, das quais uma deve ser corada e interpretada no próprio hospital e outra deve ser encaminhada apenas fixada para o Laboratório de Referência. Os tubos vazios se destinam ao envio de LCR e soro para a realização de látex e exames inespecíficos, caso estes não tenham sido realizados no hospital de origem. Acompanha o *kit* um formulário de solicitação médica de exames, onde constam informações demográficas do paciente, data do início dos sintomas, uso prévio de antibióticos, presença de petéquias. Não há neste formulário, no entanto, espaço destinado especificamente à descrição do quadro clínico dos pacientes.

Neste estudo, caso foi definido pela presença de um dos seguintes critérios: (i) crescimento de *S. pneumoniae* em cultura de LCR; (ii) detecção de antígeno capsular de *S. pneumoniae* em espécimes de LCR pelo método de aglutinação das partículas de látex; ou (iii) identificação de DGP pelo exame direto do LCR através da coloração de Gram. A adoção do critério (iii), apesar do Ministério da Saúde não considerar como caso confirmado de meningite pneumocócica aqueles nos quais o único achado é a visualização de DGP pela bacterioscopia do LCR, se justifica pelo fato de que esse critério é adotado por diversos autores e também pela OMS (Radstrom *et al.*, 1994; Cherian *et al.*, 1998; van Haeften *et al.*, 2003; WHO, 2003; Brasil, 2005a; Mani *et al.*, 2007; Welinder-Olsson *et al.*, 2007). Todos os espécimes enviados ao laboratório foram considerados elegíveis para o estudo, independente dos valores encontrados nos exames inespecíficos. Os casos foram identificados

através da consulta ao livro de registro do Laboratório Estadual de Referência para Meningites. Para cada espécime incluído foi preenchida uma ficha com dados sobre o paciente (nome, idade, sexo, endereço, data e local da coleta de LCR, além de dados clínicos, quando disponíveis), resultados dos exames inespecíficos do LCR e de hemocultura, tempo decorrido entre o início da antibioticoterapia e a punção lombar (Anexo 1). As fontes de informação utilizadas foram o livro de registro do Laboratório de Referência, os prontuários médicos do IEISS e os dados da vigilância epidemiológica da SESRJ.

5.2 Espécimes clínicos

Os espécimes de LCR que não tiveram seus exames realizados no hospital de origem foram processados para citometria, análise bioquímica, teste de aglutinação do látex, cultura e bacterioscopia conforme a rotina do Laboratório Estadual de Referência para Meningites, no IEISS. Resumidamente, os espécimes, ao chegar no laboratório, são inicialmente examinados macroscopicamente e classificados quanto à cor e ao aspecto em claro, opalescente (ou seja, ligeiramente turvo), turvo ou hemorrágico. A citometria global e específica é realizada pela inspeção, sob microscopia óptica com aumento de 400x, de uma alíquota de LCR depositada numa câmara de Fuchs-Rosenthal, após coloração com um corante a base de cristal violeta (0,2%) e ácido acético (10%). A determinação da glicose é realizada pelo método enzimático (oxidase e peroxidase) colorimétrico automatizado. Já a dosagem de proteínas é feita pelo método turbidimétrico manual, após adição de ácido tricloroacético a 3%. A bacterioscopia é realizada pela microscopia óptica, com aumento de 1000X, de um esfregaço de LCR não centrifugado corado pelo

método de Gram. Todas as lâminas realizadas pelas equipes de plantão são revisadas pela equipe técnica da rotina. A cultura é feita pela semeadura de cerca de 200µl de LCR num tubo de agar chocolate inclinado - Mueller Hinton suplementado com 10% de sangue de carneiro aquecido. Os tubos são incubados em estufa a 37°C, dentro de uma jarra vedada com 3% de CO₂, obtido pela chama de vela, e cerca de 50% de umidade, obtida com água em frasco. A identificação de *S. pneumoniae* é feita pelos seguintes achados: crescimento de colônias com morfologia sugestiva, rodeadas por halo de α-hemólise, com a presença de cocos gram-positivos solúveis em sais biliares e sensíveis à optoquina. Todos esses exames são realizados de rotina, em todos os espécimes de LCR enviados ao IEISS, independente da suspeita clínica ou da solicitação médica. Já a pesquisa de antígenos é realizada apenas nos espécimes que apresentam leucometria global superior a 100 células/ml com predomínio de polimorfonucleares (>50%), naqueles espécimes de pacientes que apresentam petéquias ao exame físico, independente da citometria, e ainda naqueles casos em que o médico assistente solicita o exame expressamente. Os antígenos bacterianos foram pesquisados nos espécimes de LCR com o *kit* comercial *BD Directgen Meningitis Combo Test*® (Becton, Dickinson and Company). Esse teste utiliza como princípio a aglutinação de partículas de látex marcadas com anticorpos de coelho (*N. meningitidis* sorogrupos A, C, Y/W135, Hib, *S. pneumoniae* e *S. agalactiae*) e rato (*N. meningitidis* sorogrupo B/*E. coli* K1), após o contato com antígenos bacterianos específicos suspensos no LCR dos pacientes com meningite causada pelas bactérias citadas. O teste do látex é realizado somente pelos técnicos responsáveis pela rotina do laboratório, um número restrito de técnicos altamente capacitados e acostumados a ver um grande número de exames diariamente. Após serem processados, os espécimes foram estocados, em

frasco estéril a 20°C negativos, no próprio laboratório do IEISS. Não houve nenhuma interferência da equipe envolvida na realização do estudo no modo como os espécimes foram encaminhados ao IEISS ou processados, após a sua chegada, até serem armazenados a -20°C.

Para a determinação da especificidade da PCR foram utilizados espécimes de LCR de pacientes com meningite bacteriana causada por *S. agalactiae* (1 espécime com cultura positiva e 4 com pesquisa de antígeno positiva, pelo método de aglutinação das partículas de látex), *L. monocytogenes* (1 espécime com cultura positiva), *S. aureus* (1 espécime com cultura positiva, obtido de um paciente com diagnóstico de abscesso cerebral), *Acinetobacter baumannii* (1 espécime com cultura positiva), *Mycobacterium tuberculosis* (1 espécime com cultura positiva), Hib (2 espécimes com BGN na bacterioscopia e látex positivo, sendo um deles também confirmado por cultura), *N. meningitidis* sorogrupos B, C, W135 e Y (18 espécimes com cultura positiva e 26 espécimes com cultura e látex negativo, apenas com bacterioscopia mostrando DGN). Foram testados ainda 5 espécimes de LCR de pacientes com sepse por *N. meningitidis* confirmada por hemocultura porém com exames no LCR negativos (Tabela 2).

Tabela 2 Espécimes de LCR utilizados para cálculo de especificidade

Espécime	Número de espécimes
LCR com cultura positiva <i>N. meningitidis</i> B, C, Y ou W135	18
LCR com bacterioscopia mostrando DGN	26
LCR com cultura, bacterioscopia ou látex positivo para <i>H.influenza</i> tipo b	2
LCR não bacteriano de pacientes com hemocultura positiva para <i>N. meningitidis</i>	5
LCR com látex ou cultura positiva <i>S. agalactiae</i>	5
LCR com cultura positiva <i>L. monocytogenes</i>	1
LCR com cultura positiva para <i>S. aureus</i>	1
LCR com cultura positiva para <i>A. baumannii</i>	1
LCR com cultura positiva para <i>M. tuberculosis</i>	1
Total	60

5.3 Ensaio da PCR

Os espécimes que preencheram os critérios de caso, assim como aqueles selecionados para determinação da especificidade (controles negativos), foram transportados sob refrigeração (isopor com gelo seco ou gelo reciclável em grande quantidade) do laboratório do IEISS para o Departamento de Bacteriologia do IOC – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Neste local foram realizadas as etapas de extração do DNA bacteriano e o ensaio da PCR para identificação de *S. pneumoniae*.

Para a extração do DNA bacteriano dos espécimes de LCR foi utilizado o *DNeasy Tissue Kit*[®] (QIAGEN), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante

para purificação de DNA de bactérias gram-positivas. Resumidamente, o processo envolveu a centrifugação do espécime de LCR (mínimo 100µl e máximo 1000µl) a 5000 x g por 10 minutos e posterior suspensão do sedimento em 180 µl de um tampão de lise enzimática. Após incubação a 37°C por 30 minutos foram adicionados 25µl de proteinase K e 200µl de tampão AL (lise), seguido de nova incubação a 70°C por mais 30 minutos. Na etapa seguinte foram acrescentados 200µl de etanol (96 a 100%) e realizada a mistura vigorosa (*vortexing*) da solução. Em seguida o material foi transferido para uma coluna, cujo fundo é formado por uma membrana com afinidade pelo DNA, acondicionada num tubo coletor. Esse conjunto foi submetido a uma nova centrifugação de modo a passar toda a mistura pela membrana, onde o DNA ficou retido, separado do álcool, demais reagentes e resíduos de matéria orgânica presentes no espécime, que ficaram no tubo coletor. Foram realizadas então duas lavagens da membrana pelo acondicionamento da coluna num novo tubo coletor, seguida da adição de tampões na coluna, nova centrifugação e posterior descarte tampão captado no tubo coletor. Essas etapas visaram retirar todo o resíduo de álcool porventura presente na membrana. A etapa final consistiu na eluição do DNA extraído e purificado da membrana para um tubo de microcentrifugação, pelo uso do tampão AE e uma última etapa de centrifugação.

Para identificar *S. pneumoniae* foi realizada a amplificação do gene *ply* através da técnica da PCR, utilizando iniciadores de oligonucleotídeos específicos (verso: TGCAGAGCGTCCTTTGGTCTAT; reverso: CTCTTACTCGTGGTTTCCAATTGA) descritos por Corless e cols. (2001), baseado na seqüência genética previamente publicada Walker e cols. (1987), para qual o tamanho do produto amplificado é 80bp. A mistura da reação da PCR (50µl) continha 0,6µM de cada iniciador (Invitrogen), 200µM dNTP, tampão da PCR, 3 mM

MgCl₂, 1U Platinun *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), e 10µl de DNA alvo. Os ensaios da PCR foram realizados num termociclador (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems) com as seguintes condições: 94°C por 3 minutos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 20 segundos (ciclo inicial); 35 ciclos subseqüentes de 92°C por 40 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 20 segundos (desnaturação, anelamento e polimerização, respectivamente); e 72°C por 10 minutos (ciclo final de polimerização). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose padrão a 2%, sob a fluorescência de ultra-violeta, após coloração com brometo de etídio. Em cada ensaio da PCR foi incluído o DNA de uma cepa padrão de *S. pneumoniae* ATCC 49619 (Coleção Estadunidense de Culturas Padrão, do inglês *American Type Culture Collection*), como controle positivo, e a mistura para reação sem DNA alvo, como controle negativo.

5.4 Rendimento do teste

A sensibilidade do ensaio da PCR foi determinada usando espécimes de LCR de casos positivos (cultura ou detecção de antígeno ou exame direto), correspondendo aos critérios i, ii e iii. Para determinar a especificidade, foram realizadas reações de amplificação utilizando DNA genômico (extraído com *DNeasy Tissue Kit*[®], Quiagen) de culturas de *N. meningitidis* (ATCC 13090), *H. influenzae* (ATCC 49766), Hib (ATCC 10211), *S. aureus* (ATCC 29213), *S. agalactiae* e *Enterococcus faecalis*, sendo as duas últimas amostras isoladas de espécimes clínicos e componentes da coleção de culturas do laboratório do IEISS. Também foram examinados espécimes de LCR de pacientes com diagnóstico de meningite bacteriana por outros agentes, que não *S. pneumoniae*, ou de sepse meningocócica

(Tabela 2). Intervalos de confiança de 95% binomiais exatos foram estimados. Para esses cálculos foi utilizado o pacote estatístico Epi Info™, Versão 3.3.2, CDC. Para comparar proporções foram utilizados os testes de Qui-quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher, e para comparar valores de sensibilidade foi utilizado o teste de McNemar. Para esses cálculos foram utilizados os pacotes estatísticos Epi Info™, Versão 6.04, CDC, e Stata®, Versão 8.0.

5.5 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ. Todos os aspectos éticos são devidamente contemplados no protocolo de investigação, seguindo as normas vigentes no Conselho Nacional de Saúde, em especial das Resoluções 196/96, 251/97 e 292/99.

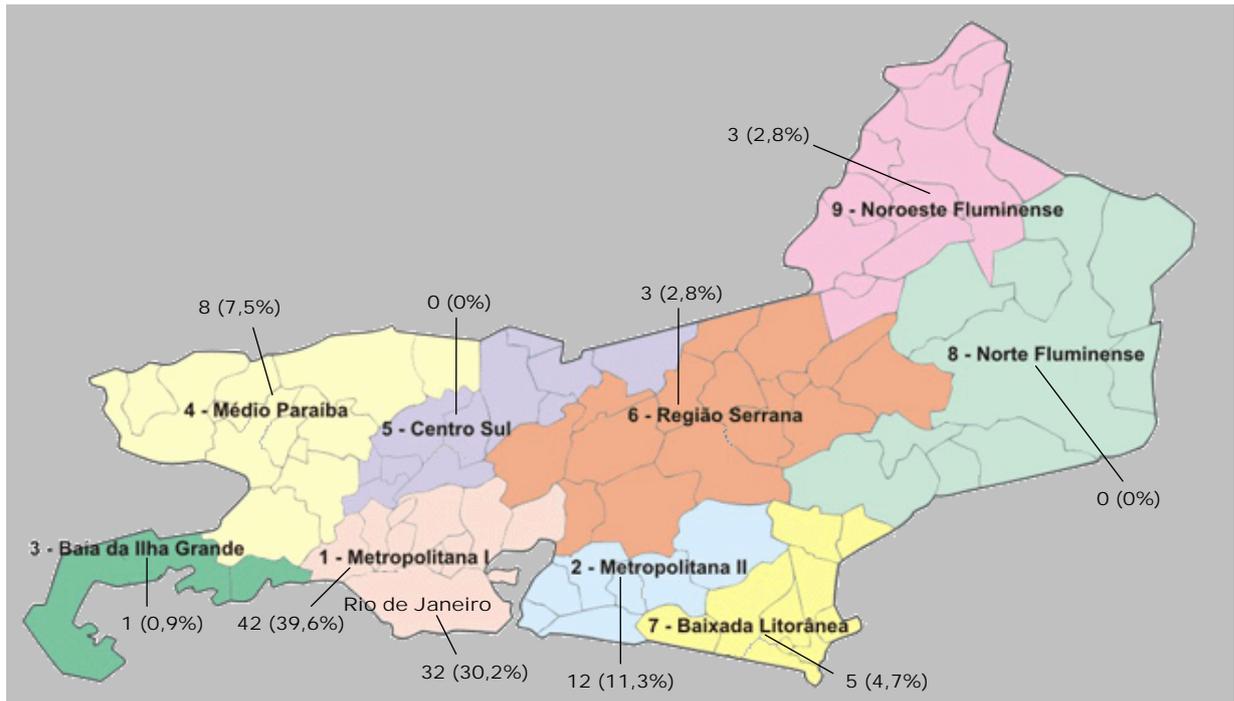
6 RESULTADOS

Entre janeiro de 2004 e janeiro de 2006 deram entrada no laboratório do IEISS cerca de 4296 espécimes clínicos de pacientes com suspeita de meningite. Destes, 4049 eram espécimes de LCR. Os demais espécimes eram sangue, soro, e outros materiais menos comuns, além de lâminas para revisão e culturas bacterianas. Dentre os espécimes de LCR, 135 preenchem os critérios para definição de caso, dos quais 92 (66,6%) foram incluídos. Os motivos de perda foram material insuficiente para realização de todos os exames de rotina (14) e PCR (2), espécimes não localizados (16), erros no processamento dos espécimes (9) e desconhecido (2). A estes espécimes foram acrescentados outros 14 espécimes, colhidos no ano 2003, perfazendo um total de 106 espécimes de LCR de pacientes com meningite por *S. pneumoniae* confirmada por um dos critérios utilizados neste estudo. O DNA dos espécimes colhidos em 2003 já havia sido extraído e estava armazenado a -20°C no laboratório do IOC no começo do estudo (amostra de conveniência). Não houve diferença significativa nos resultados de cultura, bacterioscopia e teste do látex entre os espécimes incluídos e os não incluídos, o que demonstra que não houve perda diferencial no estudo (Tabela 3).

Tabela 3 Resultados de cultura, bacterioscopia e látex nos espécimes incluídos e não incluídos no estudo.

	Percentual de resultados positivos - % (nº espécimes positivos/nº espécimes testados)		<i>p</i>
	Perdas (43)	Incluídos (106)	
Cultura	50% (20/40)	59% (63/106)	0,30
Bacterioscopia	65% (26/40)	66% (70/106)	0,90
Látex	70% (29/41)	78% (83/106)	0,33

A informação sobre idade estava disponível para 104 dos 106 pacientes. Destes, 25% tinham menos de 12 meses (média 5 meses) e 16% tinham mais de 50 anos de idade. A mediana de idade foi de 17,5 anos (1º quartil 11 meses, 3º quartil 43 anos), sendo a idade mínima de 1 mês e a máxima de 75 anos. Sessenta pacientes eram do sexo feminino (57,1%) e 45 (42,9%) eram do sexo masculino. A informação sobre sexo não estava disponível para um dos pacientes. A grande maioria dos pacientes residia na região metropolitana 1 (74 pacientes, 69,8% - n=106), sendo 32 pacientes (30,2%) no município do Rio de Janeiro e 42 pacientes (39,6%) nos demais municípios da região (Figura 2 e Anexo 2).



obs: os dados da região metropolitana I são referentes aos demais municípios da região, excetuando-se o Rio de Janeiro.

Figura 2 Distribuição dos 106 espécimes de LCR positivos para *S. pneumoniae* de acordo com a residência do paciente, segundo o plano diretor de regionalização do Estado do Rio de Janeiro (vide Anexo 2)

Tivemos acesso aos encaminhamentos para o laboratório do IEISS de 104 casos. Destes, 8 foram realizados não pelo médico assistente e sim pelo responsável pelo laboratório ou pelo serviço de vigilância epidemiológica do hospital de origem. Trinta e três foram feitos com o formulário padronizado da SESRJ onde não há espaço para descrição do quadro clínico (*kit* meningite). Dos 63 pedidos restantes, 34 tiziam a hipótese diagnóstica de meningite claramente expressa ou os sinais descritos preenchiam critério para caso suspeito de MBA da OMS (febre + desorientação ou rigidez de nuca). Em 13 casos esses critérios não eram plenamente satisfeitos, porém em 9 deles havia um ou mais sinais ou sintomas compatíveis com meningite. Dos quatro casos em que o quadro clínico era pouco sugestivo de MBA, dois tiveram cultura positiva para *S. pneumoniae*. Dos outros dois casos, um era de uma criança cuja indicação clínica foi “hidrocefalia + DVP” (onde

“DVP” provavelmente se refere à derivação ventrículo-peritoneal). Essa criança apresentava glicose baixa (26mg/dl), proteína elevada (165mg/dl) e celularidade normal (embora com a observação de que havia restos celulares), e o diagnóstico de meningite pneumocócica foi feito com base no exame de látex. No outro caso o médico responsável pela requisição do exame descreveu vários fatores de risco para MBA, mas não o quadro clínico. O LCR era francamente purulento e o diagnóstico foi feito pelo exame do látex. Nos dois casos a PCR para *S. pneumoniae* foi positivo. Em outras 16 solicitações médicas de exame de LCR a indicação clínica não foi descrita (25,4%). Esses pacientes não foram atendidos no IEISS, não sendo possível obter informações sobre a evolução clínica.

Dos 101 espécimes submetidos a inspeção, 76,2% foram descritos como turvo (69 espécimes), purulento (6 espécimes) ou opalescente (2 espécimes). Em 10 casos o espécime foi descrito como xantocrômico e em 3 como hemorrágico. Apenas 11 espécimes (10,8%) foram descritos como claros, dos quais 7 foram positivos pela cultura. Os outros 4 espécimes foram positivos pelo látex, sendo em dois deles visualizados DGP à bacterioscopia. A celularidade foi medida em 92 espécimes. A média da celularidade do LCR foi de 3.756 células/mm³; em 19,5% havia menos de 100 células/mm³ e em 5,4%, menos de 10 células/mm³. Dos que apresentavam celularidade entre 10 e 100 células/ml, 7 foram positivos pela cultura, 4 pelo látex e bacterioscopia e 2 apenas pelo látex. Dos 5 espécimes que apresentaram celularidade menor do que 10 células/ml, 4 foram positivos por cultura e um apenas pelo látex. A celularidade mediana do LCR foi de 954 células/mm³ (1º quartil 132, 3º quartil 4778), sendo a celularidade mínima 1 célula/mm³ e a máxima, 48.800 células/mm³. Os polimorfonucleares predominaram em 86,8% dos espécimes. Os resultados dos exames inespecíficos dos LCR dos pacientes com

meningite pneumocócica estão resumidos na Tabela 4. Apenas 12 espécimes não preencheram os critérios de MBA provável da OMS (vide seção 2.4). Em 9 desses espécimes a cultura foi positiva. Em um caso havia ao menos um sinal ou sintoma sugestivo de MBA e os exames de látex e bacterioscopia foram positivos, enquanto em outros 2 o único exame positivo foi o látex, sendo que num deles não havia informação clínica disponível e noutra o quadro clínico não era sugestivo de MBA (“hidrocefalia + colocação de DVP”).

Tabela 4 Achados dos exames inespecíficos de 106 espécimes de LCR de pacientes com diagnóstico de meningite por *S. pneumoniae*

	Mediana (n)	Mínimo	Máximo	Distância interquartílica
Celularidade - célis/mm ³	954 (92)	1	48.800	132 - 4778
Polimorfonucleares (%)	100 (91)	0	100	81 - 100
Glicose - mg/dl	13,5 (90)	0	121	3 - 34
Proteína - mg/dl *	282,5 (90)	10	1000	174 - 1000

* O limite superior de aferição de proteína é 1000mg/dL

Do total de 106 casos positivos, 102 espécimes foram corretamente identificados através do ensaio da PCR, enquanto a detecção de antígeno foi positiva em 83, o exame direto em 70 e a cultura em apenas 63 casos. As características desses espécimes de LCR são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 Características de 106 espécimes de LCR positivos para *S. pneumoniae*

Método de detecção de <i>S. pneumoniae</i>			Nº de espécimes	Nº (%) de espécimes positivos na PCR
Cultura	Látex	Bacterioscopia		
+	+	+	36	34 (94)
+	+	-	9	9 (100)
+	-	+	7	6 (86)
+	-	-	11	11 (100)
-	+	+	22	21 (95)
-	+	-	16	16 (100)
-	-	+	5	5 (100)
63	83	70	106	102

Utilizando como padrão a visualização de DGP na bacterioscopia ou o crescimento de *S. pneumoniae* na cultura ou o teste de látex para *S. pneumoniae* positivo em espécimes de LCR (padrão composto), calculamos a sensibilidade do ensaio da PCR *ply* no LCR, para o diagnóstico de meningite pneumocócica, em 96% (95 IC 90-99%). A performance do ensaio da PCR *ply* foi superior à performance dos métodos laboratoriais clássicos no diagnóstico desta doença. O percentual de espécimes com cultura positiva foi de 59% (95% IC 49-69%), o com DGP na bacterioscopia, 66% (95% IC 56-74%) e o com teste de látex positivo, 78% (95% IC 69-86%) (Tabela 6).

Tabela 6 Performance da reação da polimerase em cadeia (PCR), da cultura, da bacterioscopia pelo método de Gram e do teste de aglutinação de látex para o diagnóstico de meningite por *S. pneumoniae* em espécimes de LCR de 106 pacientes infectados.

Método	Número de espécimes		(%)	95% IC
	+	-		
PCR	102	4	96	90 - 99
Cultura	63	43	59	49 - 69
Bacterioscopia	70	36	66	56 - 74
Látex	83	23	78	69 - 86

Os produtos da amplificação do gene *ply* obtidos a partir do controle positivo (ATCC 49619) e de três espécimes de LCR de casos positivos que preencheram apenas um dos critérios válidos neste estudo são apresentados na Figura 3. A PCR não foi capaz de ampliar o gene *ply* em quatro casos positivos para *S. pneumoniae* por outros métodos (1 caso comprovado por cultura e bacterioscopia, 1 caso comprovado por látex e bacterioscopia e 2 casos comprovados pelos três métodos). O caso negativo pela cultura apresentava quadro clínico compatível com MBA e LCR com aspecto turvo, com celularidade alta (1180 células/mm³), embora com predomínio de mononuclear.

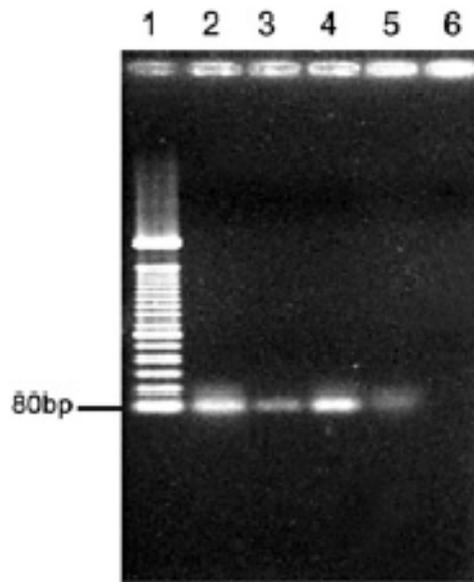


Figura 3 Amplificação pela PCR do gene *ply* de uma cepa de referência de *Streptococcus pneumoniae* e de espécimes de LCR de casos confirmados de meningite pneumocócica. 1: marcador de tamanho de DNA; 2: cepa ATCC 49619; 3: espécime com cultura positiva; 4: espécime com látex positivo; 5: espécime com DGP visualizado à bacterioscopia; 6: controle negativo.

O teste do látex foi positivo, isoladamente, em 16 espécimes de LCR (15% do total de casos). Conseqüentemente, o número de casos diagnosticados subiu de 90, quando somados os resultados de bacterioscopia e cultura, para 106. Nos 16 casos em que apenas o exame de látex foi positivo, o ensaio da PCR também apresentou resultado positivo (Gráfico 1). Caso a bacterioscopia fosse adotada como critério de meningite pneumocócica, além dos já critérios já aceitos pelo MS (cultura e látex), o número de casos com diagnóstico confirmado subiria de 101 para 106.

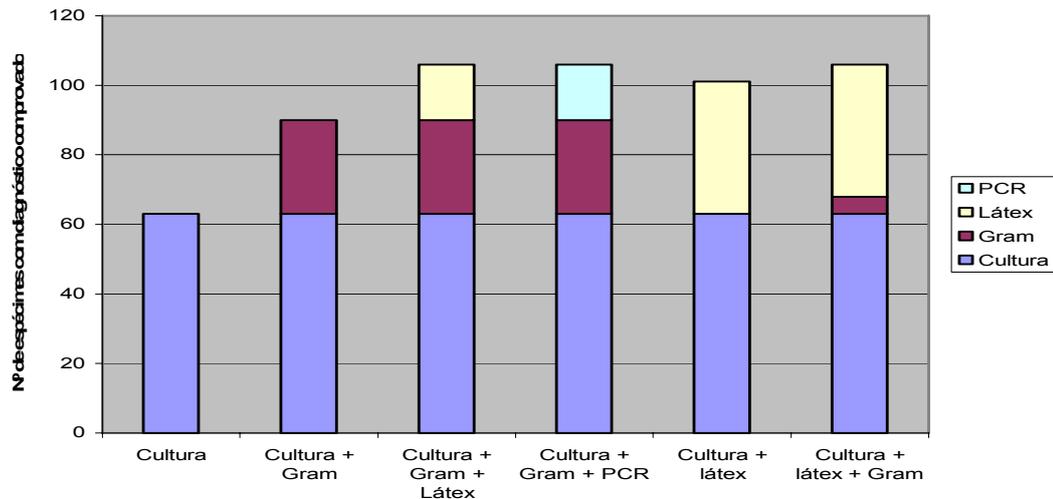


Gráfico 1 Contribuição dos exames de bacterioscopia, cultura, látex e PCR no diagnóstico de meningite pneumocócica em 106 pacientes.

Usando apenas os resultados positivos pela cultura como definição de caso (padrão ouro), podemos comparar diretamente as sensibilidades do ensaio da PCR, látex e bacterioscopia. Dentre os 63 espécimes de LCR com cultura positiva, a PCR foi positivo em 60, enquanto a bacterioscopia foi positiva em 43 e o látex em 45. As sensibilidades dos métodos foram, portanto, 95,2% (95 IC 86,7%-99,0%), 68,2% (95 IC 55,3%-79,4%) e 71,4% (95 IC 58,6%-82,1%), respectivamente. A sensibilidade do ensaio da PCR foi significativamente maior do que a bacterioscopia ($p < 0,001$) e o látex ($p = 0,001$) para o diagnóstico de meningite pneumocócica.

A especificidade do ensaio foi testada com DNA purificado de cinco cepas padrão e duas amostras de bactérias isoladas de espécimes clínicos, além do DNA extraído de espécimes de LCR de pacientes com diagnóstico de meningite por outra etiologia que não a pneumocócica. Não houve resultado falso positivo. Todos os espécimes de LCR de meningite bacteriana por outra etiologia que não a pneumocócica foram negativos no ensaio da PCR para a pesquisa de DNA de *S. pneumoniae*, assim como as amostras de DNA bacteriano, sendo a especificidade, portanto, igual a 100% (95 IC 83-100%). Nenhum produto foi amplificado desses

espécimes, porém a amplificação do gene alvo foi bem sucedida a partir do DNA da cepa padrão de *S. pneumoniae* utilizado como controle positivo interno em cada ensaio da PCR.

A informação sobre uso prévio de antibiótico estava disponível apenas para 40 pacientes, a maioria internada no IEISS (22 pacientes). Destes, 19 haviam recebido antibióticos antes da punção lombar. A cultura foi positiva para *S. pneumoniae* em 16 dos 21 pacientes que não receberam antibiótico antes da punção lombar, e em apenas 4 dos 19 pacientes puncionados após o início de antibioticoterapia ($p=0,001$). Não houve relação entre antibioticoterapia prévia e resultado de bacterioscopia e látex (tabela 6). O ensaio da PCR foi positivo em todos os pacientes que receberam antibióticos antes da punção lombar e negativo em apenas 2 dos 21 pacientes que não receberam antibioticoterapia prévia. Destes, um apresentou bacterioscopia e cultura positivos para *S. pneumoniae* no LCR, enquanto o outro apresentou bacterioscopia e látex positivos para o agente.

Os antibióticos utilizados foram ceftriaxona (15 pacientes), vancomicina (3 pacientes), cefalotina (2 pacientes), penicilina G cristalina (1 paciente), penicilina G benzatina (1 paciente), amicacina (1 paciente) e não especificado (1 paciente). Cinco pacientes usaram mais de um tipo de antibiótico: em dois o ceftriaxone foi precedido por cefalotina, um paciente fez terapia combinada (ceftriaxona e vancomicina) e uma quarta paciente fez algumas doses de vancomicina, além de ceftriaxona. A quinta paciente foi puncionada quatro vezes, das quais uma em vigência de ceftriaxona e duas em vigência de vancomicina associada a ceftriaxona. Essa paciente apresentava látex para *S. pneumoniae* persistentemente positivo, mesmo após 25 dias de ceftriaxona e 8 dias de vancomicina, e apresentou uma evolução clínica muito ruim, com coma persistente, hidrocefalia necessitando derivação ventricular

externa e várias alterações na tomografia computadorizada de crânio, segundo o relato dos médicos assistentes nas solicitações dos exames de LCR. A cultura para *M. tuberculosis* foi negativa no LCR dessa paciente. O intervalo entre o início da antibioticoterapia e a realização do procedimento variou entre 3 horas, num paciente com cultura positiva, e 25 dias, na paciente com cultura negativa porém látex para *S. pneumoniae* persistentemente positivo no LCR, apesar da antibioticoterapia. Numa outra paciente o DNA de *S. pneumoniae* pôde ser detectado 7 dias após o início da antibioticoterapia. Em cinco pacientes o tempo transcorrido entre o início da antibioticoterapia e a punção lombar não pôde ser estabelecido.

Tabela 7 Relação entre o uso de antibióticos antes da realização da punção lombar e os resultados dos exames de bacterioscopia, látex, cultura e PCR *ply* em espécimes de LCR de 106 pacientes com meningite por *S. pneumoniae*.

Método diagnóstico	Antibioticoterapia prévia (n)		p
	Sim (19)	Não (21)	
Bacterioscopia positiva – n(%)	15 (78,9%)	14 (66,6%)	0,48
Látex positivo – n (%)	18 (94,7%)	15 (71,4%)	0,09
Cultura positiva – n (%)	4 (21,0%)	16 (76,2%)	0,001
PCR positiva – n (%)	19 (100,0%)	19 (90,4%)	0,48

O ensaio da PCR foi positivo em 13 dos 14 espécimes colhidos em 2003. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a sensibilidade do ensaio da PCR encontrada nesse subgrupo de pacientes e aquela encontrada nos demais. (92,85% nos espécimes de 2003 versus 96,74%, nos espécimes de 2004 a 2006; $p=0,47$).

Dos 106 espécimes de LCR do estudo, 23 foram obtidos por meio de

punções lombares realizadas no IEISS, enquanto 81 foram encaminhados ao laboratório do IEISS por outros serviços. Em dois casos não foi possível determinar o local da punção lombar. Não houve diferença na sensibilidade do ensaio da PCR entre os pacientes puncionados no IEISS e os puncionados em outros hospitais ($p=1,0$). Os espécimes de LCR foram encaminhados por pelo menos 38 serviços de prestação de assistência à saúde. A distribuição desses serviços médicos quanto à sua localização foi proporcional à distribuição da residência dos pacientes, exceto com relação à região metropolitana 1, conforme é mostrado no Gráfico 2. Neste gráfico podemos observar a procura dos pacientes residentes nos demais municípios da região (MT1) por serviços de assistência médica no município do Rio de Janeiro (RJ).

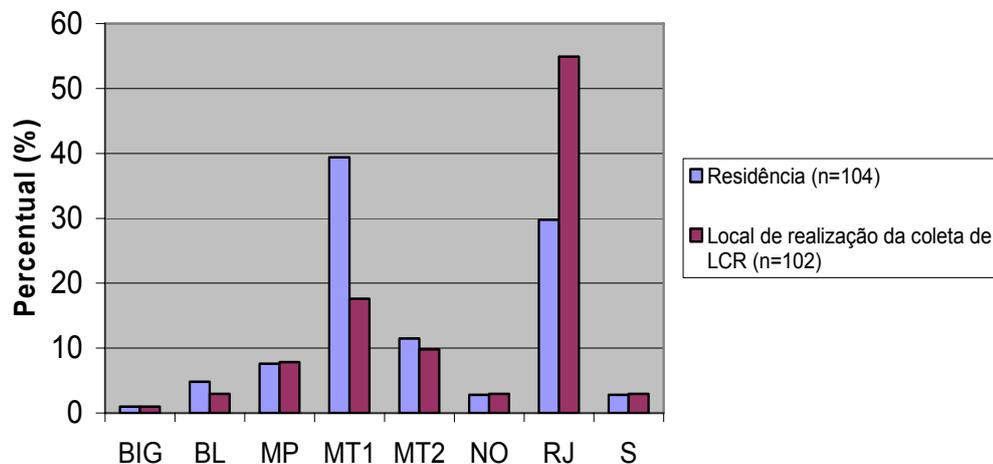


Gráfico 2 Localização da residência dos pacientes e serviços onde foram realizadas as coletas de LCR segundo o plano diretor de regionalização do Estado do Rio de Janeiro (vide Anexo 2).

Dentre os 8 espécimes provenientes da região do Médio Paraíba (MP), 2 foram negativos pela PCR (25%), o que confere uma sensibilidade da PCR nesse subgrupo de espécimes significativamente inferior à sensibilidade no restante dos casos ($p=0,03$). Os dois casos negativos foram provenientes do mesmo hospital,

assim como outros 3 casos positivos. Em 3 casos não foi possível determinar qual foi exatamente o hospital da região onde os espécimes foram coletados, e por isso os 8 casos foram analisados em conjunto. É possível que essa menor sensibilidade esteja associada a alguma particularidade no modo de processamento, acondicionamento e transporte desses espécimes até o IEISS.

Informações precisas sobre as condições de coleta e transporte dos espécimes não estavam disponíveis, pois parâmetros como hora da coleta do LCR e temperatura e acondicionamento do material clínico não são registrados rotineiramente pelos médicos assistentes e pelos técnicos responsáveis pelo recebimento do material no laboratório, respectivamente. No entanto, havia descrição de condições inadequadas de acondicionamento e transporte em 3 espécimes: 2 encaminhados em tubos com ativador de coagulação e 1 com tampa de algodão embebido no material clínico. O único parâmetro que pôde ser aferido foi o número de dias entre a coleta e chegada do LCR ao laboratório. Dos 102 espécimes nos quais essa informação estava disponível, 7 foram encaminhados ao laboratório mais de 24h após a coleta, com intervalos variando entre 2 e 16 dias. Não houve relação entre ter sido encaminhado ao laboratório mais de 24h após a coleta e o resultado da PCR ($p=0,25$).

Hemoculturas foram colhidas em apenas 37 pacientes. Dessas, 3 deram crescimento a *S. pneumoniae*, uma deu crescimento a *S. aureus*. Esse caso foi diagnosticado como meningite pneumocócica apenas pelo critério de látex. Tratava-se de uma criança de 4 anos, com LCR compatível com MBA. Não havia informação disponível sobre fatores de risco para meningite por *S. aureus*, tampouco sobre o tratamento instituído e a evolução clínica. Nesse paciente, o ensaio da PCR para amplificação do gene *ply* também foi positivo. Dos 97 pacientes que foram

submetidos a sua primeira punção lombar diagnóstica (excluindo, portanto, as ocasiões de coleta de espécimes de LCR visando não o diagnóstico, mas o controle após início da antibioticoterapia), 21 foram puncionados no IEISS, enquanto 76 foram puncionados em outros hospitais. Dos 76 pacientes puncionados pela primeira vez fora do IEISS, apenas 21 (27,6%) tiveram hemoculturas colhidas e encaminhadas ao IEISS, juntamente com o espécime de LCR, o que demonstra uma baixa adesão dos médicos do Estado do Rio de Janeiro à recomendação de se colher a hemocultura em casos de suspeita de MBA. Não podemos, no entanto, excluir a possibilidade de que tais exames tenham sido coletados e processados nos hospitais de origem. Já entre os 21 pacientes inicialmente puncionados no IEISS, 15 (71,4%) tiveram hemoculturas colhidas por esta ocasião, das quais 3 foram positivas para *S. pneumoniae*. Se considerarmos apenas os pacientes com diagnóstico de MBA pela cultura do LCR (padrão ouro), teremos que a sensibilidade da hemocultura foi de 30%. Interessantemente, todos os 10 pacientes menores de 13 anos atendidos no IEISS tiveram hemoculturas colhidas por ocasião da sua punção lombar inicial, enquanto apenas 5 dos 11 pacientes adultos tiveram hemoculturas colhidas na admissão ($p=0,01$).

7 DISCUSSÃO

O diagnóstico de meningite bacteriana é inicialmente suspeitado a partir de um quadro clínico sugestivo. Quando à clínica sugestiva se somam os achados compatíveis nos exames inespecíficos do LCR, tais como turbidez e pleocitose neutrofilica, fica configurado o critério de MBA provável, segundo as diretrizes para vigilância epidemiológica da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003). O diagnóstico etiológico da MBA é baseado nos métodos laboratoriais tradicionais de cultura, coloração pelo Gram e testes para pesquisa de antígeno (Ragunathan *et al.*, 2000; WHO, 2003; Tunkel *et al.*, 2004). Todas essas etapas diagnósticas, com a possível exceção da pesquisa de antígeno, ficam prejudicadas pela administração prévia de antibióticos, que leva a alterações nos achados de LCR, a falha no isolamento de bactérias em cultura e reduz a identificação do microrganismo na coloração de Gram (Dalton e Allison, 1968; Ragunathan *et al.*, 2000; Kanegaye *et al.*, 2001; Riordan e Cant, 2002; Nigrovic *et al.*, 2004). De fato, em um pequeno grupo de pacientes com meningite bacteriana, a terapia antimicrobiana preliminar altera os achados dos exames realizados no LCR de tal forma que torna difícil a distinção entre MBA e meningite ou encefalite viral, aumentando assim a possibilidade de erro diagnóstico.

A redução na concentração bacteriana após o tratamento antibiótico prévio para *S. pneumoniae* reduz a efetividade da coloração de Gram e da cultura de LCR (Feldman, 1978; Kanegaye *et al.*, 2001). No nosso estudo a sensibilidade da cultura foi de 76,2% entre os 21 pacientes que não receberam antibiótico antes da punção lombar contra 21,0% entre os 19 pacientes cujo LCR foi colhido após o início da

antibioticoterapia ($p=0,001$). Já o efeito da antibioticoterapia sobre os resultados da coloração de Gram não pode ser demonstrado, provavelmente pelo pequeno número de pacientes cuja informação sobre antibioticoterapia prévia estava disponível. Os resultados obtidos pelo teste de aglutinação de partículas de látex são menos afetados pela administração parenteral de antibióticos (Gray e Fedorko, 1992). No entanto, diversos estudos demonstraram que o resultado do látex pouco ou em nada interfere na conduta terapêutica de pacientes com meningite bacteriana, mesmo após o uso de antibióticos (Perkins *et al.*, 1995; Hayden e Frenkel, 2000; Nigrovic *et al.*, 2004). A sensibilidade do teste de látex, na literatura, varia entre 59% e 100% (Gray e Fedorko, 1992; Hayden e Frenkel, 2000; Nigrovic *et al.*, 2004). No presente estudo, o teste de látex apresentou sensibilidade de 71,4%, quando comparado à cultura. A performance do exame não foi afetada de forma significativa pela antibioticoterapia prévia. Dos 106 espécimes avaliados, 16 (15%) foram positivos apenas pelo teste do látex, com bacterioscopia e cultura negativas. No nosso estudo, portanto, o exame de látex se mostrou válido, ampliando o número de casos diagnosticados em 17,7%, em relação à cultura e à bacterioscopia. Esses 16 espécimes também foram positivos para a pesquisa do gene *ply* pela técnica da PCR. Este achado é compatível com o encontrado por Yaro e cols. (2006), que, ao utilizar o teste de látex na vigilância de meningite pneumocócica na África, encontraram um acréscimo ainda mais expressivo (62,2%) no número de casos confirmados pelo método, em relação à cultura. Tal valor pode ser devido a uma pior performance da cultura naquele cenário. Neste estudo, todos os casos confirmados pelo látex também o foram pela PCR (Yaro *et al.*, 2006). Já no estudo de Kennedy e cols. (2007), realizado na Ásia, o látex em nada contribuiu para o aumento no número de casos diagnosticados, em relação à cultura (Kennedy *et al.*, 2007). A

antibioticoterapia prévia também não afetou de forma significativa os resultados do ensaio da PCR apresentados no nosso estudo, embora o número de pacientes avaliados tenha sido muito pequeno. Tais achados são comparáveis aos de Bronska e cols. (2006), que demonstraram que a antibioticoterapia prévia reduziu de forma significativa a sensibilidade da cultura de sangue e LCR, mas não a do látex e da PCR, para o diagnóstico de doença meningocócica invasiva (Bronska *et al.*, 2006).

A punção lombar é frequentemente adiada na admissão dos casos mais graves ou até a realização de exames de imagem de crânio em pacientes imunocomprometidos ou com sinais neurológicos específicos (Riordan e Cant, 2002). Além disso, em muitos casos a antibioticoterapia é iniciada antes mesmo do paciente ser admitido no hospital, em concordância com diversas orientações terapêuticas publicadas (Begg *et al.*, 1999; Tunkel *et al.*, 2004). Tal conduta parece se correlacionar com melhor prognóstico, já que o início precoce de antibióticos, especialmente se anterior à deteriorização do quadro clínico, esteve associado de forma independente a uma menor morbi-letalidade em certos estudos retrospectivos (Aronin *et al.*, 1998; Miner *et al.*, 2001; Proulx *et al.*, 2005). Não obstante, espécimes de LCR obtidos nessas circunstâncias podem ser estudados através da PCR para detecção do gene de interesse com boa sensibilidade (Borrow *et al.*, 1997; Riordan e Cant, 2002). Num estudo foi demonstrada a detecção de DNA bacteriano pelo ensaio da PCR em espécimes de LCR obtidos até 72h após o início de antibióticos (Ragunathan *et al.*, 2000). Bronska e cols. (2006) foram capazes de detectar DNA de *N. meningitidis* no LCR de pacientes até o 7º dia após início de antibiótico. Bryant e cols. (2004) detectaram DNA de *N. meningitidis* no sangue de 1/3 dos pacientes com doença meningocócica até 72h após o início da antibioticoterapia. Em um paciente o DNA bacteriano foi detectado até 9 dias após o início do tratamento (Bryant *et al.*,

2004). No nosso estudo foi possível detectar o DNA de *S. pneumoniae*, pela amplificação do gene *ply* através da PCR, no LCR de uma paciente 25 dias após o início do tratamento com ceftriaxone, dos quais 8 em associação com vancomicina. Esta paciente apresentava látex para *S. pneumoniae* persistentemente positivo, e foi puncionada repetidamente devido a uma evolução clínica desfavorável. Não podemos descartar tanto a possibilidade de falha terapêutica, já que as culturas foram negativas e não havia como determinar a sensibilidade de *S. pneumoniae* aos antimicrobianos, quanto a hipótese de supuração do SNC não drenada.

Ensaio baseado na PCR têm fornecido importantes informações epidemiológicas pela detecção e caracterização de agentes causadores de meningite bacteriana, com maior sensibilidade que a cultura e o exame direto e com excelente especificidade (Borrow *et al.*, 1997; Ragunathan *et al.*, 2000; Clarke, 2003; Parent du Chatelet *et al.*, 2005; Bronska *et al.*, 2006). No presente estudo o ensaio da PCR demonstrou ser uma técnica altamente sensível para identificação de *S. pneumoniae*, através da detecção do gene *ply*, no LCR de pacientes infectados, com melhor performance quando comparada aos métodos de cultura, coloração de Gram e teste de aglutinação de partículas de látex. Tal resultado vem sendo corroborado por inúmeros autores. A maior sensibilidade dos ensaios baseados na PCR pode ser medida quantitativamente, pela determinação da sensibilidade analítica. Na literatura esses valores variam entre 5 UFC/ml e 1000 UFC/ml, com diferentes ensaios baseados na PCR (Cherian *et al.*, 1998; Backman *et al.*, 1999; van Haeften *et al.*, 2003; Freeman *et al.*, 2004; Schuurman *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2007; Welinder-Olsson *et al.*, 2007). Embora o LCR de pacientes com MBA possa ter baixas concentrações bacterianas (*e.g.* 10 UFC/ml), cerca de 84% desses espécimes apresentam concentrações bacterianas superiores a 1000 UFC/ml antes do início da

antibioticoterapia (La Scolea e Dryja, 1984; Gray e Fedorko, 1992). O número de bactérias viáveis no LCR, no entanto, cai rapidamente após o início da antibioticoterapia (Kanegaye *et al.*, 2001). Os ensaios baseados na PCR permanecem positivos mesmo que as bactérias tenham perdido a viabilidade, seja pela ação de agentes físicos ou químicos (*e.g.* variações de temperatura, antibióticos), desde que seja mantida a integridade do DNA. Tal característica confere vantagem sobre a cultura, cujo desempenho depende da viabilidade da bactéria (Nolte, 2003; Van Gastel *et al.*, 2007). Os valores de sensibilidade analítica dos métodos baseados na PCR relatados na literatura são bem menores do que os exigidos pela coloração de Gram e pelo látex. La Scolea e Dryja (1984) demonstraram que a positividade da bacterioscopia (Gram e azul de metileno), realizada a partir de sedimento obtido após centrifugação por 15min a 15.000 x g, é de apenas 25% quando a concentração bacteriana no LCR é menor ou igual a 1.000 UFC/ml (La Scolea e Dryja, 1984). Já o teste do látex, no estudo de Holloway e cols. (1992), só foi capaz de detectar antígenos bacterianos em espécimes com concentração bacteriana acima de 10^6 UFC/ml. Nesse estudo *in vitro*, a positividade pelo látex se manteve nessas amostras com altas concentrações bacterianas, mesmo com a subsequente diminuição no número ou ausência de bactérias viáveis, durante as 72h do estudo (Holloway *et al.*, 1992). Vale ressaltar que 44% dos pacientes com MBA apresentam concentração bacteriana no LCR inferior a 10^5 UFC/ml (La Scolea e Dryja, 1984). A obtenção do espécime de LCR ou o início de antibioticoterapia eficaz antes que a concentração bacteriana no LCR atinja o patamar exigido pelo látex pode ser a explicação para a existência de espécimes positivos pela cultura e negativos pelo látex, assim como pode justificar a possível relação entre antibioticoterapia prévia e diminuição na sensibilidade desse exame,

sugerida em alguns estudos (Nigrovic *et al.*, 2004).

A sensibilidade analítica do ensaio da PCR apresentado nesse estudo não foi determinada. No entanto, a comparação com a performance da bacterioscopia pelo método de Gram, a da pesquisa de antígeno pelo teste de aglutinação de partículas de látex e a da cultura pôde ser realizada pela adoção da positividade por pelo menos um desses métodos tradicionais como critério de caso. Tal estratégia foi adotada por outros estudos, com achados semelhantes (Tabela 8). Van Gastel e cols. (2007) utilizaram RT-PCR multiplex para *N. meningitidis* (gene *ctrA*) e *S. pneumoniae* (gene *ply*) de rotina na avaliação de todos os casos com quadro clínico sugestivo de MBA atendidos num hospital da Bélgica num período de 4 anos. Foram considerados casos comprovados de MBA aqueles com bacterioscopia, cultura ou PCR positivas. Dos casos de meningite por *S. pneumoniae* comprovada, o ensaio da PCR foi positivo em 100%, enquanto a cultura foi positiva em 36% e o Gram, em 62% (Van Gastel *et al.*, 2007). Num estudo de vigilância de MBA por *S. pneumoniae* e Hib na Ásia, foi utilizado os métodos de cultura, látex, PCR-EIA para Hib (gene *bexA*) e PCR-EIA (gene *ply*) para *S. pneumoniae*, em espécimes de LCR. Foi adotado como critério de caso confirmado a positividade por qualquer um dos métodos. A cultura e do látex conseguiram diagnosticar 66,7% e 58,3% dos casos de meningite pneumocócica, respectivamente, enquanto a PCR-EIA detectou 100% desses casos (Kennedy *et al.*, 2007). Nesses dois trabalhos, todos os espécimes positivos pelos demais métodos foram detectados pela PCR. Mani e cols. (2007) fizeram um estudo retrospectivo na Índia, no qual 385 casos de MBA (definidos como quadro clínico compatível associado a >100 neutrófilos/mm³ ou a resultado de Gram, cultura ou látex positivo no LCR) ocorridos num período 10 anos foram analisados. A sensibilidade do Gram foi de 65,7% e a da cultura foi de 40,8%. Em 11

espécimes positivos para *S. pneumoniae* foi realizada PCR aninhada para a amplificação do gene *ply*. A sensibilidade do método foi de 100% (Mani *et al.*, 2007). No nosso estudo, dos 106 casos diagnosticados pela bacterioscopia, Gram ou látex, 96% foram positivos pela PCR, enquanto apenas 59%, 66% e 78% o foram pela cultura, Gram e látex, respectivamente. Diferenças nas características clínicas dos pacientes (*e.g.*, percentual de pacientes submetidos a antibioticoterapia prévia), nas condições de coleta e transporte e nas metodologias utilizadas podem explicar as diferenças de sensibilidade dos métodos tradicionais observadas entre esses estudos e o nosso. Nos trabalhos de Kennedy e cols. e Van Gastel e cols., a inclusão da positividade pela PCR como um dos critérios de caso também contribuiu para a menor performance demonstrada pelo látex, no primeiro, e pela cultura, no segundo, em relação aos nossos achados (Kennedy *et al.*, 2007; Van Gastel *et al.*, 2007). No trabalho de Mani e cols., a adoção do critério clínico citológico para definição de caso pode ter contribuído para a redução dos valores de sensibilidade dos métodos tradicionais avaliados.

Tabela 8 Resumo com os principais dados de alguns trabalhos publicados sobre uso de técnicas baseadas na PCR para diagnóstico de meningite pneumocócica.

Artigo (autor, ano)	País	Técnica	Gene	Nº de espécimes testados pela PCR	Sensibilidade				Especificidade PCR	Nº de casos diagnosticados apenas pela PCR
					Cultura	Látex	Gram	PCR		
Van Gastel e cols., 2007	Bélgica	RT-PCR multiplex	<i>ply</i>	88	36,0%	-	62,0%	100,0%	100,0%	35,0%
Kennedy e cols., 2007	Ásia*	PCR-EIA	<i>ply</i>	577	66,7%	58,3%	-	100,0%	100,0%	33,3%
Mani e cols., 2007	Índia	PCR aninhada	<i>ply</i>	11	40,8%	-	65,7%	100,0%	93,7%	-
Matos, 2007	Brasil	PCR convencional	<i>ply</i>	106	59,4%	78,3%	66,0%	96,2%	100,0%	-
Van Haeften e cols., 2003	Austrália	RT-PCR	<i>ply</i>	36	-	-	-	100,0%	96,6%	-
Corless e cols., 2001	Reino Unido	RT-PCR multiplex	<i>ply</i>	36	-	-	-	91,8%	100,0%	-
Tzanakaki e cols., 2005	Grécia	PCR convencional multiplex	<i>ply</i>	24	-	-	-	91,7%	100,0%	-
Chanteau e cols., 2006	Niger	PCR multiplex	<i>lytA</i>	3791	-	-	-	87,8%	-	39,0%
Cherian e cols., 1998	Índia	PCR-EIA	<i>lytA</i>	38	-	-	-	85,7%	88,8%	-
Parent du Chatelet e cols., 2005	Burkina Faso	-	<i>lytA</i>	-	-	-	-	79,0%	-	27,0%

* Vietnã, Coréia e China

A sensibilidade da bacterioscopia pelo método de Gram, na literatura, varia entre 75 e 90%, enquanto a do látex gira entre 59 e 100%. No nosso estudo, a sensibilidade do Gram foi de 68,2%, enquanto a do látex foi de 71,4%, tendo como padrão ouro a cultura de LCR. A baixa sensibilidade do Gram pode ser devida à interferência da antibioticoterapia prévia, já que é sabido que esta diminui a positividade desse exame. No nosso estudo, o número de pacientes nos quais essa informação estava disponível era muito baixo, não permitindo uma adequada avaliação desse parâmetro. Já a sensibilidade da PCR, quando comparada à cultura, foi de 95,2%. A diferença entre a sensibilidade da PCR e as da bacterioscopia e látex foi estatisticamente significativa. Outros autores determinaram a sensibilidade dos ensaios da PCR no diagnóstico de meningite pneumocócica utilizando como padrão ouro espécimes de LCR com cultura positiva (Tabela 8). Corless e cols. (2001), num estudo para validação de um ensaio da RT-PCR multiplex para diagnóstico de MBA por *N. meningitidis*, Hib e *S. pneumoniae*, encontraram uma sensibilidade de 91,8% e uma especificidade de 100% para o diagnóstico de meningite pneumocócica. O valor de sensibilidade um pouco menor do que o obtido com o nosso ensaio, apesar do uso da técnica em tempo real e do mesmo par de iniciadores, não pôde ser atribuída à presença de inibidores no soro ou sangue, pois a sensibilidade no LCR foi de 91,3% (21 em 23 espécimes) e a no sangue/soro, 92,3% (12 em 13 espécimes); tampouco houve diferença entre a sensibilidade obtida nos ensaios individuais e naqueles realizados com os demais iniciadores (multiplex). Nesse estudo o DNA foi extraído com um *kit* comercial de extração e purificação, e armazenado a -20°C por 2 a 8 meses antes da realização da PCR (Corless *et al.*, 2001). No entanto, tal armazenamento, também realizado em 14 espécimes testados no nosso estudo, não acarretou uma diminuição significativa

da sensibilidade do ensaio da PCR por nós validado, sendo portanto pouco provável que isso tenha influenciado os resultados daqueles autores. Tzanakaki e cols. (2005) testaram um ensaio da PCR convencional multiplex para o diagnóstico de meningite por *N. meningitidis*, Hib e *S. pneumoniae*. Este ensaio, que utilizava os mesmos iniciadores do nosso estudo, apresentou sensibilidade de 91,7%. Foi utilizado como padrão ouro 24 espécimes de pacientes com meningite pneumocócica comprovada por cultura (sangue ou LCR). Não houve diferença na sensibilidade obtida nos espécimes de sangue ou LCR. A extração de DNA do LCR foi realizada através da técnica de fervura (Tzanakaki *et al.*, 2005). Uma possível explicação para a pequena diferença entre os resultados de sensibilidade observados no nosso estudo e os encontrados nos trabalhos desses autores é o pequeno número de espécimes testados nos últimos, além da diferença na extração de DNA mencionada. Parent du Chatelet e cols. (2005) utilizaram um ensaio para amplificação do gene *lytA* para detecção de DNA de *S. pneumoniae* no LCR, e encontrou uma sensibilidade de 79% entre os casos de meningite pneumocócica diagnosticados por cultura do LCR. A autora atribuiu a baixa sensibilidade ao tempo transcorrido entre a coleta e o processamento dos espécimes (até 14 dias) ou a alguma deficiência na extração do DNA. Nesse estudo as técnicas de extração de DNA e detecção de produto de amplificação não foram explicitadas (Parent du Chatelet *et al.*, 2005). Chanteau e cols. (2006) e Cherian e cols. (1998), também utilizando ensaios baseados na PCR para amplificação do gene *lytA*, encontraram sensibilidades semelhantes quando utilizaram a cultura como padrão ouro (87,8% e 85,7% respectivamente). No trabalho de Chanteau e cols. os espécimes foram mantidos entre 4°C e 8°C quando o armazenamento a -20°C não era possível, e o DNA foi extraído pela técnica de fervura. Já no trabalho de Cherian e cols. os espécimes foram processados

imediatamente após a chegada ao laboratório, e armazenados a -70°C . Para a extração do DNA foi utilizado um *kit* comercial de extração e purificação do mesmo fabricante do *kit* utilizado no nosso trabalho (QUIAGEN). A menor sensibilidade encontrada por esses três autores em relação à apresentada no nosso estudo pode ser devida a uma menor sensibilidade dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene *lytA* no LCR para diagnóstico de meningite pneumocócica. Adicionalmente, diferenças na coleta, conservação e processamento dos espécimes e na metodologia de extração de DNA podem explicar a menor sensibilidade dos trabalhos de Chanteau e cols. e Parent du Chatelet e cols. em relação ao nosso. No nosso estudo, as condições de armazenamento e transporte dos espécimes do hospital de origem até o laboratório do IEISS não puderam ser adequadamente avaliadas. Ter sido encaminhado ao laboratório do IEISS 24h ou mais após a coleta não pareceu ter influenciado a sensibilidade do método da PCR no nosso trabalho, porém o número de espécimes encaminhados nestas condições foi pequeno, o que pode ter afetado a avaliação desse parâmetro.

No presente estudo, o ensaio da PCR para amplificação do gene *ply* foi negativo quando realizado com DNA de cepas padrão de diferentes espécies bacterianas e com todos os espécimes de LCR de pacientes com meningite causada por outros agentes que não *S. pneumoniae*. A especificidade do método, portanto, foi de 100%. Na maioria dos estudos que avaliaram ensaios da PCR para amplificação do gene *ply* no LCR a especificidade encontrada também foi de 100% (Corless *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004; Tzanakaki *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2007; Van Gastel *et al.*, 2007). No estudo de Van Haeften e cols. (2003) a especificidade da PCR no LCR foi de 96,6%. Os espécimes de LCR utilizados como controle negativo apresentavam bacterioscopia e cultura negativos, porém não foram

colhidos de pessoas saudáveis, não sendo possível, portanto, excluir o diagnóstico de meningite pneumocócica (van Haeften *et al.*, 2003). No estudo de Mani e cols. (2007) o ensaio da PCR *ply* aninhada apresentou uma especificidade de 93,7%. O teste foi positivo em dois pacientes que tiveram meningite por *M. tuberculosis* diagnosticada por autópsia. A possibilidade de co-infecção com *S. pneumoniae* não pôde ser descartada (Mani *et al.*, 2007). Um caso clínico semelhante foi recentemente diagnosticado, primeiramente por PCR e depois por cultura, no Departamento de Bacteriologia da FIOCRUZ. Tratava-se de uma infecção mista por *S. pneumoniae* e *M. tuberculosis* em uma criança de 9 anos com meningite subaguda (Barroso DE, comunicação pessoal).

A expressão do gene *ply* por algumas espécies de estreptococos do grupo Mitis causa algumas restrições quanto ao seu uso como ferramenta diagnóstica. O uso de métodos moleculares baseados na detecção e amplificação do gene *ply* não é útil para a identificação de amostras de *Streptococcus* sp. de difícil caracterização, como pôde ser demonstrado em vários estudos (Neeleman *et al.*, 2004; Carvalho Mda *et al.*, 2007). Do mesmo modo, sua aplicabilidade na detecção do agente diretamente em espécimes clínicos fica prejudicada, especialmente naqueles oriundos do trato respiratório, já que tanto *S. pneumoniae* quanto *Streptococcus* do grupo Mitis habitam o trato respiratório superior (Neeleman *et al.*, 2004; Winn Jr., 2006; Carvalho Mda *et al.*, 2007). No entanto, os estreptococos do grupo viridans, no qual estão incluídos os do grupo Mitis, raramente são causa de meningite, sendo relatados na literatura percentuais de 0,3 a 5%. A meningite provocada por tais agentes acomete predominantemente faixas etárias diferentes daquelas mais atingidas por *S. Pneumoniae* e é habitualmente associada a fatores de risco específicos (Enting *et al.*, 1997; Johnson, 2005). A meningite por estreptococos

viridans tem maior incidência entre adultos do que entre crianças, e freqüentemente está associada a supuração do SNC e endocardite (Lu *et al.*, 2001; Johnson, 2005). É causa de meningite nosocomial, sendo descrita sua associação a inúmeros procedimentos invasivos, como mielografia, punção lombar, neurocirurgia, termocoagulação do gânglio glasseriano, manipulação do trato genital feminino, *etc.* (Enting *et al.*, 1997; Johnson, 2005). A não observância de medidas de controle de infecção, especialmente o uso de máscara durante a realização de punção lombar, já foi relacionada a casos de meningite iatrogênica por estreptococos do grupo viridans (Johnson, 2005). O achado de estreptococos do grupo viridans em cultura de LCR, no entanto, representa muito mais freqüentemente contaminação do que propriamente infecção (Johnson, 2005). Devido ao limiar de detecção das técnicas baseadas na PCR, a chance de falso positivo devido a contaminação é mínima (Parent du Chatelet *et al.*, 2005). No nosso estudo nós não testamos o ensaio da PCR *ply* em amostras de *Streptococcus* do grupo viridans, tampouco em espécimes de LCR de pacientes com meningite causada por tais agentes, já que no período do estudo nenhum caso de meningite por esse grupo de bactérias foi documentado dentre os espécimes recebidos no IEISS, refletindo a baixa incidência da doença na nossa população. No entanto, diversos autores avaliaram a especificidade de seus ensaios baseados na PCR com amostras de *Streptococcus* do grupo viridans, incluindo os do grupo Mitis, o de maior semelhança genética com *S. pneumoniae*. Smith e cols. (2004), Kennedy e cols. (2007) e van Haeften e cols. (2003) não observaram resultados falso positivos com técnicas da PCR para ampliação do gene *ply* em amostras de *Streptococcus* do grupo viridans (van Haeften *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2007). O ensaio de Backman e cols. (1999) não foi capaz de discriminar entre *S. pneumoniae* e outros estreptococos α -hemolíticos,

porém os autores utilizaram iniciadores para a amplificação de outros genes que não o *ply* (Backman *et al.*, 1999).

A aplicação do protocolo da PCR apresentado nesse estudo foi efetiva na detecção de *S. pneumoniae* no LCR e representa uma abordagem eficaz para a sua detecção no LCR e uma ferramenta eficiente para aprimorar a vigilância das meningites bacterianas. Embora o ensaio da PCR para detecção do gene *ply*, isoladamente, possa parecer suficiente como um teste de triagem e confirmação diagnóstica, é prudente ter em consideração a possibilidade de resultados discrepantes. A PCR, como qualquer outra técnica, não resolve todos os problemas diagnósticos, como pôde ser demonstrado pelos resultados negativos em quatro casos positivos para *S. pneumoniae* por outros métodos. A falha do método nesses espécimes de LCR possivelmente se deve à presença de uma substância inibidora da reação. Embora menos provável, outra possível explicação para este resultado seria as condições inadequadas de coleta, transporte e armazenamento, especialmente em relação aos dois espécimes provenientes do mesmo hospital, na região do Médio Paraíba. O congelamento e o descongelamento repetidos de um espécime clínico podem levar à degradação do DNA bacteriano e, conseqüentemente, à ruptura da seqüência alvo. A presença de fatores inibitórios da PCR, que é pequena em espécimes de LCR, assim como as situações que podem levar à perda da integridade do DNA, podem ser bastante reduzidas quando o DNA bacteriano é extraído tão logo o espécime chegue ao laboratório para análise (Clarke, 2003). A existência de pouco material genético no espécime é uma hipótese pouco provável, em virtude da positividade por outras técnicas diagnósticas que apresentam um limiar de detecção habitualmente mais elevado do que o da PCR.

Os ensaios baseados na PCR têm sido utilizados com sucesso para ampliar

a vigilância das meningites bacterianas tanto em países desenvolvidos quanto nos países da África e Ásia, onde as condições de coleta e transporte dos espécimes clínicos nem sempre são adequadas e a infraestrutura laboratorial é extremamente deficiente (Parent du Chatelet *et al.*, 2005; Chanteau *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2007; Van Gastel *et al.*, 2007). Na Bélgica, um estudo mostrou que o uso de rotina da RT-PCR multiplex para *N. meningitidis* (*ctrA*) e *S. pneumoniae* (*ply*) em casos com suspeita de meningite bacteriana, segundo a avaliação do médico assistente, elevou o percentual de casos de MBA pneumocócica e meningocócica comprovada de 30% (cultura e bacterioscopia) para 52%. Dentre os casos de meningite pneumocócica, 35% foram identificados apenas pela PCR (5 dos 14 casos). Esse exame foi responsável, portanto, por aumentar em 55,5% o número de casos de meningite pneumocócica diagnosticados (Van Gastel *et al.*, 2007). Em Niger, foi realizada PCR multiplex para *N. meningitidis* (*crgA*), *S. pneumoniae* (*lytA*) e Hib (*bexA*) na avaliação de rotina dos espécimes de LCR coletados de pacientes com suspeita de MBA, segundo a avaliação do médico assistente. O percentual de pacientes com diagnóstico etiológico de MBA confirmado subiu de 16,3% (cultura isoladamente) para 31,1% (cultura e PCR), dentre os 850 espécimes nos quais ambos os exames foram realizados. Dos casos de meningite pneumocócica, 39% (21 em 54) foram diagnosticados apenas pela PCR. Este exame, portanto, aumentou o número de casos confirmados de meningite por *S. pneumoniae* em 63,6%, em relação à cultura (Chanteau *et al.*, 2006). Num estudo realizado em Burkina Faso, 27% dos casos de meningite pneumocócica detectados entre abril de 2002 e abril de 2003 foram diagnosticados exclusivamente pelo ensaio da PCR (*lytA*) (Parent du Chatelet *et al.*, 2005). Kennedy e cols. (2007) utilizaram ensaios da PCR-EIA para Hib (*bexA*) e para *S. pneumoniae* (*ply*), além da cultura e látex, para ampliar a

vigilância das meningites bacterianas em crianças menores de 5 anos no Vietnã, Coréia e China. Os critérios de elegibilidade eram a presença de algum sinal ou sintoma sugestivo de meningite (febre, cefaléia, vômitos em jato, abaulamento de fontanela, convulsão ou alteração de consciência) e LCR anormal (e.g. >10 leucócitos/mm³ ou proteína > 75mg/dl ou >70% neutrófilos). Foram realizados cultura, látex e PCR (*ply*) em 577 crianças, dentre as quais foram diagnosticados apenas 12 casos de meningite pneumocócica, refletindo o critério de suspeita diagnóstica bastante amplo utilizado no estudo. Desses, 4 casos foram diagnosticados apenas pela PCR (33,3%), o que permitiu elevar o percentual de confirmação de 1,38% (cultura) para 2,07%. Ou seja, a PCR aumentou o número de casos confirmados em 50%, em relação à cultura. O látex não contribuiu para o aumento no número de casos confirmados, em relação à cultura. Já a PCR para Hib foi feita em 1063 crianças, sendo diagnosticados 40 casos, dos quais 16 (40%) apenas pela PCR, o que permitiu aumentar o percentual de casos confirmados de 2,25% (cultura e látex) para 3,76% (Kennedy *et al.*, 2007). No nosso estudo, a contribuição do método da PCR para o diagnóstico de meningite pneumocócica não pode ser avaliada, pois o teste foi utilizado para a sua padronização e validação, sendo aplicado, portanto, a uma população sabidamente infectada e outra sabidamente não infectada pelo agente. Tomando por base os dados da literatura, no entanto, é de se supor que esse exame seria capaz de ampliar a vigilância também na população estudada (Estado do Rio de Janeiro). Com os nossos dados, podemos afirmar apenas que este ensaio da PCR é capaz de contribuir para o diagnóstico da meningite pneumocócica no mínimo tanto quanto qualquer um dos exames tradicionais, já que ele foi 100% positivo em todas as instâncias em que apenas um desses exames foi o critério definidor de caso (Tabela 5 e Gráfico 1).

A ausência de laboratórios confiáveis para cultura e identificação dos agentes etiológicos mais comuns de meningite bacteriana, na maior parte do vasto território brasileiro, impede a vigilância microbiológica fora das áreas urbanas. Em certas áreas remotas, como na região amazônica, até mesmo nas capitais a infraestrutura de transporte e os recursos humanos inadequados, aliados à ausência de laboratórios de microbiologia, são problemas críticos para a saúde pública (Pedro *et al.*, 2007). É possível estocar espécimes de sangue não coagulado em temperatura ambiente por 1 a 5 dias para realização da PCR sem que haja perda de sensibilidade (Kaczmarek e Cartwright, 1995). Neste estudo, nós validamos o ensaio da PCR para amplificação do gene *ply* sem que houvesse otimização das condições de coleta e transporte dos espécimes de LCR, com sensibilidade e especificidade comparáveis aos resultados obtidos em diversas publicações (Corless *et al.*, 2001; Clarke, 2003; van Haeften *et al.*, 2003; Tzanakaki *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2007; Van Gastel *et al.*, 2007). Esse achado torna claros os benefícios da adoção da técnica da PCR para a vigilância de meningite bacteriana no Brasil. As condições para coleta, armazenagem e transporte de espécimes frescos de LCR são simples e podem ser implementadas a baixo custo, a exemplo do que foi feito em Níger, onde os espécimes de LCR eram estocados entre 4 e 8°C ou, quando possível, a -20°C nas unidades primárias e recolhidos por uma equipe do centro de referência a intervalos regulares (Sidikou *et al.*, 2003; Chanteau *et al.*, 2006). O uso rotineiro desta técnica de diagnóstico molecular deverá aumentar os casos confirmados laboratorialmente de meningite por *S. pneumoniae*, em relação aos confirmados por cultura. Vale ressaltar que, de acordo com as recomendações para a vigilância de meningite do Ministério da Saúde do Brasil, a presença de DGP num esfregaço de LCR, isoladamente, não é critério válido para a definição de caso de meningite

pneumocócica (G00.1, CID-10) (Brasil, 2002; Brasil, 2005a). Portanto, o uso da PCR neste cenário deve ampliar ainda mais a vigilância deste patógeno.

Ensaio da PCR, como o proposto nesse trabalho, não devem ser adotados como uma abordagem alternativa à cultura, na medida em que esta técnica fornece informações acerca da resistência aos antimicrobianos e dos sorotipos envolvidos, além de permitir a vigilância sobre outras bactérias menos associadas a meningite (Chanteau *et al.*, 2006). Contudo devem ser vistos como uma alternativa ao teste de látex, que apresenta menor sensibilidade e um alto custo, de cerca de R\$ 2.500,00 reais por um kit com 25 reações, o que significa um custo de R\$ 100,00 por exame. Vale lembrar, ainda, que existem ensaios da PCR para a amplificação do gene da PBP2B capazes de detectar e diferenciar amostras de *S. pneumoniae* sensíveis e resistentes a penicilina a partir de espécimes clínicos (du Plessis *et al.*, 1998; Kearns *et al.*, 2002). Também já foram desenvolvidos ensaios da PCR multiplex para o diagnóstico de *S. pneumoniae* e identificação de certos sorotipos (O'Halloran D e Cafferkey, 2005). Tais ensaios poderiam ampliar a vigilância sobre a resistência pneumocócica à penicilina e sobre o perfil de sorotipos circulantes no nosso meio.

Apesar dos avanços na tecnologia da RT-PCR, este método é mais caro do que a técnica convencional, e seu uso de rotina, restrito (Corless *et al.*, 2001). Portanto, a introdução da RT-PCR em laboratórios públicos de análises clínicas no Brasil parece uma possibilidade remota. O ensaio da PCR apresentado aqui pode ser uma solução satisfatória para ser implementada a nível central nos laboratórios de referência (Lacen) localizados em cada estado, onde os procedimentos laboratoriais diagnósticos para a maioria das doenças infecciosas estão concentrados. Tal centralização se faz necessária devido ao custo de instalação e manutenção dos equipamentos, a validade dos reagentes e a exigência por mão de

obra especializada (Baron, 2006). Uma vez instalada a infra-estrutura, no entanto, o custo por teste, levando-se em consideração apenas o gasto com reagentes e material descartável, é comparável ao da cultura e inferior ao teste do látex. O custo do ensaio da PCR apresentado no nosso estudo é de cerca de R\$37,00 (custo de reagentes e material descartável), enquanto o custo do teste de látex, no Brasil, é de cerca de R\$100,00 por exame. Levando-se em consideração que foram notificados 140 casos de meningite pneumocócica no ano de 2005 no Estado do Rio de Janeiro (Fonte: DDTR/CV/SSC/SESRJ), podemos supor, com base nos nossos resultados, que cerca de 21 casos foram diagnosticados apenas pelo látex (15%). Supondo-se ainda que este exame foi realizado pelo menos em todos os casos de meningite pneumocócica e nos de MBA não especificada ($140 + 280 = 420$), temos que o custo anula deste método é de R\$ 42.000,00. Conseqüentemente, são gastos R\$2.000,00 (equivalente a 20 exames) por diagnóstico adicional, em relação aos realizados pela cultura, atribuível ao látex. Por outro lado, tomando como base os dados bastante consistentes de estudos de vigilância epidemiológica que apontam para um acréscimo de no mínimo 50% (50 a 63,6%) no número de casos diagnosticados de meningite pneumocócica ao se adotar a técnica da PCR de rotina, é de se supor que o número de casos da doença notificados em 2005 subiria de 119, diagnosticados apenas pela cultura, para 178, dos quais 59 diagnosticados exclusivamente às custas do resultado da PCR. Esse número corresponderia a 33,3% do total de casos, compatível também com os valores da literatura (Tabela 8) (Parent du Chatelet *et al.*, 2005; Chanteau *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2007; Van Gastel *et al.*, 2007). Admitindo-se que o exame seria realizado no mesmo número de espécimes citado anteriormente (420 espécimes), temos que o custo da PCR por diagnóstico adicional em relação ao que é atualmente obtido pela cultura seria de R\$263,38

(sete exames), enquanto o gasto anual com a realização da PCR seria de R\$15.540,00. Conclui-se, portanto, que a substituição do teste do látex pelo teste da PCR na rotina laboratorial para diagnóstico de meningite pneumocócica não só ampliaria a vigilância epidemiológica como seria uma estratégia custo-efetiva.

O método da PCR discutido no presente estudo é capaz de fornecer a identificação precisa da espécie bacteriana em poucas horas. Uma vez o DNA extraído e pronto para uso, o protocolo da PCR descrito nesse estudo pode ser realizado rapidamente, com um tempo total de 4 horas entre o início do ensaio e a obtenção do resultado. O tempo entre o início da extração do DNA até a liberação do resultado pode ser abreviado quando os espécimes são submetidos à técnica de fervura a 100°C e posterior centrifugação para obtenção de DNA não puro para PCR, o que também acarreta uma diminuição no custo (de R\$37,00 para R\$21,00). No entanto, este método de extração de DNA não foi utilizado no nosso trabalho, sendo portanto recomendável a realização de estudos para avaliar a performance diagnóstica do ensaio da PCR com utilização de DNA não purificado. O tempo necessário para a obtenção do resultado de um ensaio da PCR representa outra vantagem em relação à cultura, cujo resultado só é conhecido após 24 a 48h. (Van Gastel *et al.*, 2007; Welinder-Olsson *et al.*, 2007)

Até onde nos foi possível averiguar, através de consulta às bases de dados LILACS, Medline e ISI Web of Science, este é o primeiro estudo realizado no nosso país visando à validação de um ensaio da PCR para o diagnóstico de meningite pneumocócica. Um estudo publicado por um grupo do Rio Grande do Sul buscou validar um ensaio da PCR multiplex semi-aninhado para diagnóstico simultâneo de *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *Streptococcus sp.* Tal ensaio, no entanto, não era capaz de distinguir *S. pneumoniae* das diferentes espécies do gênero *Streptococcus*

(Failace *et al.*, 2005).

O nosso estudo apresenta como vantagem um alto poder de extrapolação dos dados para a realidade do diagnóstico da meningite pneumocócica no Estado do Rio de Janeiro. Isso se deve, em primeiro lugar, ao fato de que o número de espécimes testados é bastante representativo do número de casos registrados nessa população. No período de 01/2004 a 12/2005 foram notificados à Secretaria Estadual de Saúde 269 casos de meningite pneumocócica. Nesse mesmo período, deram entrada no IEISS 128 espécimes que preencheram critério para caso confirmado dessa doença (foram descontadas os 3 espécimes recebidos em 2006 e 4 espécimes só positivos por DGP recebidos entre 2004 e 2005). Isso corresponde a 47,58% de todos os casos de meningite pneumocócica do Estado do Rio de Janeiro. O estudo só pôde ser realizado com 88 desses espécimes (32,71% de todos os casos notificados), mas, levando-se em consideração que essa perda não foi diferencial, é de se supor que ela não tenha afetado de forma importante a validade extrínseca do nosso estudo. Além do expressivo número de espécimes testados, não houve interferência por parte da equipe envolvida no estudo nas condições em que os espécimes foram coletados, transportados, processados e armazenados até a realização dos ensaios. Um outro mérito do nosso estudo foi o uso da análise estatística para comparar os valores de sensibilidade do ensaio da PCR, da bacterioscopia e do látex, conforme descrito por Trajman & Luiz (*in press*) e seguindo as normas preconizadas pela iniciativa *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy* (STARD). Tal iniciativa recomenda que os resultados de novos testes diagnósticos sejam comparados a um teste de referência e a margem de incerteza da sua acurácia seja estatisticamente reportada, através de testes apropriados, como o McNemar χ^2 utilizado no nosso estudo, ou de intervalos de

confiança (Bossuyt *et al.*, 2003 APUD Trajman e Luiz, *in press*).

O nosso estudo, no entanto, apresenta algumas limitações. Não foi possível fazer uma correlação entre o padrão composto (bacterioscopia ou cultura ou látex positivos) de doença pneumocócica com dados de evolução clínica, o que ajudaria a validar o critério. Isso teria sido particularmente útil no esclarecimento do diagnóstico da doença nos pacientes que não preenchem o critério da OMS de MBA provável (aquele com quadro clínico não descrito no pedido médico e a criança que apresentava “hidrocefalia + DVP”), e na criança com critério de MBA mas que teve crescimento de *S. aureus* na hemocultura. Nos três pacientes o único critério para caso positivo foi o resultado do exame de látex. No entanto, no caso das MBA os critérios de resposta clínica são muito subjetivos, já que alguns pacientes se recuperam relativamente rápido e sem seqüelas, enquanto outros apresentam seqüelas graves. Por outro lado, existe uma importante superposição (30 a 40%) de resultados de exames inespecíficos no LCR entre os pacientes com MBA e os pacientes com meningite por outras etiologias. Tais exames podem até mesmo estar normais em certos pacientes com MBA, o que se correlaciona com pior prognóstico (Gray e Fedorko, 1992; Tunkel, 2005a). A semelhança entre a sensibilidade do ensaio da PCR aferida contra o padrão ouro tradicional (cultura) e aquela obtida pela comparação com o padrão composto é um forte indício da validade desse padrão alternativo, que permitiu a ampliação do poder da estimativa pelo aumento do número de espécimes avaliados, com conseqüente estreitamento do intervalo de confiança. Por outro lado, o fato dos exames utilizados como critério de caso terem sido realizados no Laboratório de Referência para Meningites do Estado do Rio de Janeiro, onde se encontram técnicos altamente capacitados e habituados a processar um grande número de espécimes, nos leva a crer que a especificidade de

tais exames é bastante alta e compatível com os altos índices relatados na literatura. A confirmação da etiologia pneumocócica nos 5 casos cujo único critério diagnóstico foi a visualização de DGP à bacterioscopia corrobora essa observação, e sugere que este exame, pelo menos quando feito nas condições citadas, pode ser uma ferramenta para ampliar a vigilância epidemiológica da meningite pneumocócica a curtíssimo prazo e baixíssimo custo.

Uma outra limitação do nosso estudo foi não ter adotado como um dos critérios de caso a positividade da hemocultura. No entanto, em virtude da carência de dados clínicos seria difícil determinar a origem da bacteremia por *S. pneumoniae*, se relacionada a um quadro meníngeo ou se decorrente de uma infecção em outro sítio, especialmente pneumonia, nos casos com achados de exames inespecíficos de LCR normais ou pouco alterados. Por outro lado, o pequeno número de espécimes nos quais a hemocultura foi realizada na nossa amostra reflete a baixa adesão das equipes de saúde à recomendação de se colher hemocultura de todo o caso suspeito de MBA. Desta feita, o número de espécimes que deixaram de ser incluídos pela ausência desse critério de caso foi provavelmente irrisório. Ademais, no atual cenário, a confirmação de um caso de meningite por *S. pneumoniae* apenas pela hemocultura deve ser baixo uma vez que, mesmo em condições ideais, isto é, hemocultura colhida na admissão de pacientes que tiveram o diagnóstico de meningite pneumocócica confirmada por cultura de LCR, a positividade foi de apenas 30%. Outra limitação foi o fato de não termos testado o nosso método na população com suspeita de meningite, porém com exames específicos negativos. É nesta população que a PCR se mostrará uma ferramenta útil para a confirmação de caso, e de posse dos resultados da performance do teste nestes pacientes será, no futuro, possível determinar com mais precisão a aplicabilidade clínica do método, ou

seja, sua contribuição para o aumento no número de casos comprovados. Tal meta, no entanto, foge aos objetivos do nosso trabalho, desenhado para a validação do método da PCR por nós padronizado, e deverá ser almejada por estudos subseqüentes. O pequeno número de pacientes nos quais a informação sobre antibioticoterapia estava disponível, a não realização da medida da sensibilidade analítica e a não inclusão de espécimes positivos para *Streptococcus* do grupo Mitis foram outras limitações, já comentadas ao longo da discussão.

Em resumo, o desempenho do ensaio da PCR apresentado nesse trabalho, comparado aos das três outras técnicas laboratoriais clássicas, fornece evidências de que o teste tem uma performance diagnóstica melhor, podendo, portanto, contribuir para o aprimoramento da vigilância de meningite bacteriana. Os testes baseados na amplificação de ácidos nucléicos possuem uma alta sensibilidade inerente ao método e exercem um papel importante no diagnóstico de meningite bacteriana devido à sua capacidade de detectar o DNA de bactérias tornadas não cultiváveis pela ação letal de agentes físicos ou dos antimicrobianos. Conseqüentemente, a técnica da PCR deve ser considerada como teste definidor de diagnóstico nos casos positivos, com base nos dados apresentados neste e em outros estudos, previamente publicados (Ragunathan *et al.*, 2000; Corless *et al.*, 2001; Clarke, 2003; Sidikou *et al.*, 2003; Parent du Chatelet *et al.*, 2005).

8 CONCLUSÕES

- A PCR para amplificação do gene *ply* foi validada na população do Estado do Rio de Janeiro para o diagnóstico da meningite pneumocócica.
- Este ensaio apresentou sensibilidade superior à do látex e à da bacterioscopia, e uma melhor performance diagnóstica entre os casos confirmados de meningite pneumocócica em relação aos três métodos tradicionais: bacterioscopia pelo Gram, cultura e pesquisa de antígenos pela aglutinação de partículas de látex.
- A antibioticoterapia prévia não afetou a sensibilidade da PCR, embora tenha alterado de forma significativa os resultados da cultura. O DNA alvo foi detectado mesmo em espécimes coletados mais de 24 horas após o início do tratamento.

9 RECOMENDAÇÕES

- O ensaio da PCR validado neste trabalho deve ser adotado como critério definidor para o diagnóstico de meningite pneumocócica no Estado do Rio de Janeiro.
- Este exame deve substituir o uso do látex na rotina diagnóstica, já que apresenta melhor performance e menor custo.
- O achado de DGP à bacterioscopia, desde que realizado por técnico experiente, deve ser adotado como critério para confirmação de caso de meningite pneumocócica após o período neonatal, ampliando a vigilância dessa doença a curtíssimo prazo.
- Deve ser enfatizada na formação médica a recomendação de se coletar hemoculturas em todos os pacientes com suspeita de MBA, assim como a de se preencher corretamente os formulários de solicitação de exames.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam HJ, Schurek KN, Nichol KA, Hoban CJ, Baudry TJ, Laing NM, Hoban DJ, Zhanel GG. Molecular characterization of increasing fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Canada, 1997 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(1):198-207.
- Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci* 1994; 39(2):362-72.
- Al-Soud WA, Jonsson LJ, Radstrom P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1):345-50.
- Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, Quesne G, Carvalho Mda G, Steigerwalt AG, Morey RE, Jackson D, Davidson RJ, Facklam RR. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10):4686-96.
- Aronin SI, Peduzzi P, Quagliarello VJ. Community-acquired bacterial meningitis: risk stratification for adverse clinical outcome and effect of antibiotic timing. *Ann Intern Med* 1998; 129(11):862-9.
- Backman A, Lantz P, Radstrom P, Olcen P. Evaluation of an extended diagnostic PCR assay for detection and verification of the common causes of bacterial meningitis in CSF and other biological samples. *Mol Cell Probes* 1999; 13(1):49-60.
- Baldy JLS. Estreptococcias. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 1299-1332.
- Baron EJ. Implications of new technology for infectious diseases practice. *Clin Infect Dis* 2006; 43(10):1318-23.
- Beall B, McEllistrem MC, Gertz RE, Jr., Wedel S, Boxrud DJ, Gonzalez AL, Medina MJ, Pai R, Thompson TA, Harrison LH, McGee L, Whitney CG. Pre- and postvaccination clonal compositions of invasive pneumococcal serotypes for isolates collected in the United States in 1999, 2001, and 2002. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3):999-1017.

- Begg N, Cartwright KA, Cohen J, Kaczmarek EB, Innes JA, Leen CL, Nathwani D, Singer M, Southgate L, Todd WT, Welsby PD, Wood MJ. Consensus statement on diagnosis, investigation, treatment and prevention of acute bacterial meningitis in immunocompetent adults. British Infection Society Working Party. *J Infect* 1999; 39(1):1-15.
- Bell WE, McCormick WF. Neurologic infections in children. *Major Probl Clin Pediatr* 1981; 12(2nd Ed):1-709.
- Berkley JA, Lowe BS, Mwangi I, Williams T, Bauni E, Mwarumba S, Ngetsa C, Slack MP, Njenga S, Hart CA, Maitland K, English M, Marsh K, Scott JA. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *N Engl J Med* 2005; 352(1):39-47.
- Bishai W. The in vivo-in vitro paradox in pneumococcal respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(3):433-6.
- Bisno AL, Ruoff, K L. Classification of Streptococci. In: Mandell GL, Bennett, J E, Dolin, R, editor. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 2360-62.
- Bleck TP, Greenlee, J E. Approach to the Patient with Central Nervous System Infection. In: Mandell GL, Bennett, J E, Dolin, R, editor. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 950-959.
- Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004; 4(3):144-54.
- Borrow R, Claus H, Guiver M, Smart L, Jones DM, Kaczmarek EB, Frosch M, Fox AJ. Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialyltransferase (siaD) PCR ELISA. *Epidemiol Infect* 1997; 118(2):111-7.
- Brandileone MC, Casagrande ST, Guerra ML, Zanella RC, Andrade AL, Di Fabio JL. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. *J Med Microbiol* 2006; 55(Pt 5):567-74.
- Brandileone MC, de Andrade AL, Di Fabio JL, Guerra ML, Austrian R. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. *J Infect Dis* 2003; 187(8):1206-12.
- Brasil. Meningite por Pneumococo. In: FUNASA, editor. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 5 ed. Brasília: FUNASA; 2002. p. 621-632.

- Brasil MdS, Secretaria de Vigilância em Saúde. Meningites. In: Ministério da Saúde SdVeS, editor. Guia de vigilância epidemiológica. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005a. p. 541-569.
- Brasil P, Marzochi, K, Wakimoto, M, Stela-Silva, N. Meningoencefalites infecciosas. In: Coura JR, editor. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005b. p. 297-317.
- Bronska E, Kalmusova J, Dzupova O, Maresova V, Kriz P, Benes J. Dynamics of PCR-based diagnosis in patients with invasive meningococcal disease. Clin Microbiol Infect 2006; 12(2):137-41.
- Brueggemann AB, Spratt BG. Geographic distribution and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates. J Clin Microbiol 2003; 41(11):4966-70.
- Bryant PA, Li HY, Zaia A, Griffith J, Hogg G, Curtis N, Carapetis JR. Prospective study of a real-time PCR that is highly sensitive, specific, and clinically useful for diagnosis of meningococcal disease in children. J Clin Microbiol 2004; 42(7):2919-25.
- Butler JC, Levine OS. The changing landscape of epidemic bacterial meningitis in Africa: new opportunities for prevention. J Infect Dis 2005; 192(2):189-91.
- Byington CL, Samore MH, Stoddard GJ, Barlow S, Daly J, Korgenski K, Firth S, Glover D, Jensen J, Mason EO, Shutt CK, Pavia AT. Temporal trends of invasive disease due to *Streptococcus pneumoniae* among children in the intermountain west: emergence of nonvaccine serogroups. Clin Infect Dis 2005; 41(1):21-9.
- Cardoso MR, Nascimento-Carvalho CM, Ferrero F, Berezin EN, Ruvinsky R, Camargos PA, Sant'anna CC, Brandileone MC, de Fatima PMM, Feris-Iglesias J, Maggi RS, Benguigui Y. Penicillin-resistant pneumococcus and risk of treatment failure in pneumonia. Arch Dis Child 2008; 93(3):221-5.
- Carrol ED, Newland P, Riordan FA, Thomson AP, Curtis N, Hart CA. Procalcitonin as a diagnostic marker of meningococcal disease in children presenting with fever and a rash. Arch Dis Child 2002; 86(4):282-5.
- Cartwright K, Reilly S, White D, Stuart J. Early treatment with parenteral penicillin in meningococcal disease. Bmj 1992; 305(6846):143-7.
- Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, Steigerwalt A, Whaley M, Facklam RR, Fields B, Carlone G, Ades EW, Dagan R, Sampson JS. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. J Clin Microbiol 2007; 45(8):2460-6.

- Castanheira M, Gales AC, Mendes RE, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America: results from five years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(7):645-51.
- Castanheira M, Gales AC, Pignatari AC, Jones RN, Sader HS. Changing antimicrobial susceptibility patterns among *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Microb Drug Resist* 2006; 12(2):91-8.
- Castanheira M, Jones RN, Silbert S, Brandileone MC, Sader HS. Typing and molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to cefotaxime isolated in Latin America. *Microb Drug Resist* 2003; 9(4):345-51.
- CDC. Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease--United States, 1998-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005; 54(36):893-7.
- CDC. Pneumococcal Disease. In: Atkinson W HJ, McIntyre L, Wolfe S, editor. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 10 ed. Washington DC: Public Health Foundation; 2007.
- Chandler LJ, Reisner BS, Woods GL, Jafri AK. Comparison of four methods for identifying *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 37(4):285-7.
- Chanteau S, Rose AM, Djibo S, Nato F, Boisier P. Biological diagnosis of meningococcal meningitis in the African meningitis belt: current epidemic strategy and new perspectives. *Vaccine* 2007; 25 Suppl 1:A30-6.
- Chanteau S, Sidikou F, Djibo S, Moussa A, Mindadou H, Boisier P. Scaling up of PCR-based surveillance of bacterial meningitis in the African meningitis belt: indisputable benefits of multiplex PCR assay in Niger. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100(7):677-80.
- Chen DK, McGeer A, de Azavedo JC, Low DE. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *Canadian Bacterial Surveillance Network*. *N Engl J Med* 1999; 341(4):233-9.
- Cherian T, Lalitha MK, Manoharan A, Thomas K, Yolken RH, Steinhoff MC. PCR-Enzyme immunoassay for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in cerebrospinal fluid samples from patients with culture-negative meningitis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12):3605-8.

- Cisneros-Herreros JM, Sanchez-Gonzalez M, Prados-Blanco MT, Llanos-Rodriguez C, Vigil-Martin E, Soto-Espinosa de los Monteros B, Pachon-Diaza J. [Blood cultures in the emergency department]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23(3):135-9.
- Clarke SC, Edwards G. F. S. Guidance for requests and interpretation of services provided by the Scottish Meningococcus and Pneumococcus Reference Laboratory. *SCIEH Weekly Report* 2003; 37:1-6.
- Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4):1553-8.
- Craig AS, Erwin PC, Schaffner W, Elliott JA, Moore WL, Ussery XT, Patterson L, Dake AD, Hannah SG, Butler JC. Carriage of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and impact of chemoprophylaxis during an outbreak of meningitis at a day care center. *Clin Infect Dis* 1999; 29(5):1257-64.
- Crook DW, Spratt BG. Multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Br Med Bull* 1998; 54(3):595-610.
- Cutts FT, Zaman SM, Enwere G, Jaffar S, Levine OS, Okoko JB, Oluwalana C, Vaughan A, Obaro SK, Leach A, McAdam KP, Biney E, Saaka M, Onwuchekwa U, Yallop F, Pierce NF, Greenwood BM, Adegbola RA. Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2005; 365(9465):1139-46.
- Dagan R, Gradstein S, Belmaker I, Porat N, Siton Y, Weber G, Janco J, Yagupsky P. An outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in a closed community in southern Israel. *Clin Infect Dis* 2000; 30(2):319-21.
- Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Greenberg D, Abramson O, Mendelman PM, Bohidar N, Yagupsky P. Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* 1996; 174(6):1271-8.
- Dalton HP, Allison MJ. Modification of laboratory results by partial treatment of bacterial meningitis. *Am J Clin Pathol* 1968; 49(3):410-3.
- de Gans J, van de Beek D. Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2002; 347(20):1549-56.

- de la Campa AG, Balsalobre L, Ardanuy C, Fenoll A, Perez-Trallero E, Linares J. Fluoroquinolone resistance in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones, Spain. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(10):1751-9.
- du Plessis M, Smith AM, Klugman KP. Rapid detection of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in cerebrospinal fluid by a seminested-PCR strategy. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2):453-7.
- Dunbar SA, Eason RA, Musher DM, Clarridge JE, 3rd. Microscopic examination and broth culture of cerebrospinal fluid in diagnosis of meningitis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(6):1617-20.
- Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS, Jr., Swartz MN. Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 1993; 328(1):21-8.
- Enting RH, de Gans J, Blankevoort JP, Spanjaard L. Meningitis due to viridans streptococci in adults. *J Neurol* 1997; 244(7):435-8.
- Failace L, Wagner M, Chesky M, Scalco R, Jobim LF. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus* sp. by polymerase chain reaction for the diagnosis of bacterial meningitis. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63(4):920-4.
- Feldman WE. Effect of prior antibiotic therapy on concentrations of bacteria in CSF. *Am J Dis Child* 1978; 132(7):672-4.
- Felmingham D, Canton R, Jenkins SG. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001-2004. *J Infect* 2007; 55(2):111-8.
- Finland M. Pneumococcal infections. In: Evans AS, Feldman, H A, editor. *Bacterial infections of humans: epidemiology and control*. New York: Plenum Medical; 1982. p. 417-433.
- Flannery B, Heffernan RT, Harrison LH, Ray SM, Reingold AL, Hadler J, Schaffner W, Lynfield R, Thomas AR, Li J, Campsmith M, Whitney CG, Schuchat A. Changes in invasive Pneumococcal disease among HIV-infected adults living in the era of childhood pneumococcal immunization. *Ann Intern Med* 2006; 144(1):1-9.
- Fletcher RH, Fletcher, Suzanne W., Wagner, Edward H. *Epidemiologia clínica: elementos essenciais*. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1996.
- Focaccia R. Meningites bacterianas: etioepidemiologia e meningites agudas. In: Veronesi R, Focaccia, R, editor. *Veronesi: Tratado de infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu; 1996. p. 805-820.

- Freeman HR, Mai NT, Diep TS, Parry C, Hien TT, Farrar JJ. The role of the polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial meningitis in Vietnam. *Ann Trop Med Parasitol* 2004; 98(1):65-70.
- Garcia S, Levine OS, Cherian T, Gabastou JM, Andrus J. Pneumococcal disease and vaccination in the Americas: an agenda for accelerated vaccine introduction. *Rev Panam Salud Publica* 2006; 19(5):340-8.
- Gardam MA, Miller MA. Optochin revisited: defining the optimal type of blood agar for presumptive identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1998; 36(3):833-4.
- Gill VJ, Fedorko, D P, Witebsky, F G. The clinician and the microbiology laboratory. In: Mandell GL, Bennett, J E, Dolin, R, editor. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 203-241.
- Gordon SB, Kanyanda S, Walsh AL, Goddard K, Chaponda M, Atkinson V, Mulwafu W, Molyneux EM, Zijlstra EE, Molyneux ME, Graham SM. Poor potential coverage for 7-valent pneumococcal conjugate vaccine, Malawi. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(6):747-9.
- Gray LD, Fedorko DP. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5(2):130-45.
- Greenberg D, Givon-Lavi N, Broides A, Blancovich I, Peled N, Dagan R. The contribution of smoking and exposure to tobacco smoke to *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* carriage in children and their mothers. *Clin Infect Dis* 2006; 42(7):897-903.
- Greenwood B. Pneumococcal meningitis epidemics in Africa. *Clin Infect Dis* 2006; 43(6):701-3.
- Hanage WP, Kaijalainen TH, Syrjanen RK, Auranen K, Leinonen M, Makela PH, Spratt BG. Invasiveness of serotypes and clones of *Streptococcus pneumoniae* among children in Finland. *Infect Immun* 2005; 73(1):431-5.
- Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30(1):100-21.
- Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* 2005; 5(2):83-93.
- Hayden RT, Frenkel LD. More laboratory testing: greater cost but not necessarily better. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(4):290-2.

- Heffelfinger JD, Dowell SF, Jorgensen JH, Klugman KP, Mabry LR, Musher DM, Plouffe JF, Rakowsky A, Schuchat A, Whitney CG. Management of community-acquired pneumonia in the era of pneumococcal resistance: a report from the Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. *Arch Intern Med* 2000; 160(10):1399-408.
- Heyderman RS, Lambert HP, O'Sullivan I, Stuart JM, Taylor BL, Wall RA. Early management of suspected bacterial meningitis and meningococcal septicaemia in adults. *J Infect* 2003; 46(2):75-7.
- Hirst RA, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol* 2004; 138(2):195-201.
- Ho PL, Que TL, Tsang DN, Ng TK, Chow KH, Seto WH. Emergence of fluoroquinolone resistance among multiply resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(5):1310-3.
- Ho PL, Yung RW, Tsang DN, Que TL, Ho M, Seto WH, Ng TK, Yam WC, Ng WW. Increasing resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones: results of a Hong Kong multicentre study in 2000. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48(5):659-65.
- Holloway Y, Boersma WG, Kuttschrutter H, Snijder JA. Minimum number of pneumococci required for capsular antigen to be detectable by latex agglutination. *J Clin Microbiol* 1992; 30(2):517-9.
- Hoshino K, Watanabe H, Sugita R, Asoh N, Ntabaguzi SA, Watanabe K, Oishi K, Nagatake T. High rate of transmission of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* between parents and children. *J Clin Microbiol* 2002; 40(11):4357-9.
- Iqbal J, Sher A, Hira PR, Al-Owaish R. Comparison of the OptiMAL test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11):3644-6.
- Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Gruneberg RN. The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(2):229-46.
- Johnson CC, Tunkel, A R. Viridans Streptococci, Groups C and G Streptococci, and *Gemella morbillorum*. In: Mandell GL, Bennett, J E, Dolin, R, editor. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 2434-2451.

- Kaczmarek EB, Cartwright KA. Control of meningococcal disease: guidance for microbiologists: CDC. Consultant in Communicable Disease Control, England. *Commun Dis Rep CDR Rev* 1995; 5(13):R196-8.
- Kanegaye JT, Soliemanzadeh P, Bradley JS. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. *Pediatrics* 2001; 108(5):1169-74.
- Kaplan SL, Mason EO, Jr., Wald ER, Schutze GE, Bradley JS, Tan TQ, Hoffman JA, Givner LB, Yogev R, Barson WJ. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 2004; 113(3 Pt 1):443-9.
- Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 1995; 45(2):406-8.
- Kawamura Y, Whiley RA, Shu SE, Ezaki T, Hardie JM. Genetic approaches to the identification of the mitis group within the genus *Streptococcus*. *Microbiology* 1999; 145 (Pt 9):2605-13.
- Kearns AM, Graham C, Burdess D, Heatherington J, Freeman R. Rapid real-time PCR for determination of penicillin susceptibility in pneumococcal meningitis, including culture-negative cases. *J Clin Microbiol* 2002; 40(2):682-4.
- Kennedy WA, Chang SJ, Purdy K, Le T, Kilgore PE, Kim JS, Anh DD, Huong PL, Dong BQ, Tan DM, Clemens JD, Ward JI. Incidence of bacterial meningitis in Asia using enhanced CSF testing: polymerase chain reaction, latex agglutination and culture. *Epidemiol Infect* 2007; 135(7):1217-26.
- Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3(2):171-96.
- Klugman KP. Bacteriological evidence of antibiotic failure in pneumococcal lower respiratory tract infections. *Eur Respir J Suppl* 2002; 36:3s-8s.
- Klugman KP, Lonks JR. Hidden epidemic of macrolide-resistant pneumococci. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(6):802-7.
- Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 2003; 349(14):1341-8.

- Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(12):721-36.
- Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, Craig AS, Hadler J, Reingold A, Thomas AR, Harrison LH, Bennett NM, Farley MM, Facklam RR, Jorgensen JH, Besser J, Zell ER, Schuchat A, Whitney CG. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* 2006; 354(14):1455-63.
- La Scolea LJ, Jr., Dryja D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance. *J Clin Microbiol* 1984; 19(2):187-90.
- Le Monnier A, Carbonnelle E, Zahar JR, Le Bourgeois M, Abachin E, Quesne G, Varon E, Descamps P, De Blic J, Scheinmann P, Berche P, Ferroni A. Microbiological diagnosis of empyema in children: comparative evaluations by culture, polymerase chain reaction, and pneumococcal antigen detection in pleural fluids. *Clin Infect Dis* 2006; 42(8):1135-40.
- Leib SL, Tauber MG. Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13(3):527-48, v-vi.
- Leimkugel J, Adams Forgor A, Gagneux S, Pfluger V, Flierl C, Awine E, Naegeli M, Dangy JP, Smith T, Hodgson A, Pluschke G. An outbreak of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* meningitis in northern Ghana with features that are characteristic of *Neisseria meningitidis* meningitis epidemics. *J Infect Dis* 2005; 192(2):192-9.
- Libman E. A pneumococcus producing a peculiar form of hemolysis. *Proc NY Pathol Soc* 1905; 5:168.
- Low DE. Changing trends in antimicrobial-resistant pneumococci: it's not all bad news. *Clin Infect Dis* 2005; 41 Suppl 4:S228-33.
- Lu CH, Chang WN, Chang HW. Adults with meningitis caused by viridans streptococci. *Infection* 2001; 29(6):305-9.
- Makwana N, Nye K, Riordan FA. Meningitis without a petechial rash in children in the Hib vaccine era. *J Infect* 2004; 49(4):297-301.
- Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, Jr., Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44 Suppl 2:S27-72.

- Mani R, Pradhan S, Nagarathna S, Wasiulla R, Chandramuki A. Bacteriological profile of community acquired acute bacterial meningitis: a ten-year retrospective study in a tertiary neurocare centre in South India. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25(2):108-14.
- Mantese OC, Paula A, Moraes AB, Moreira TA, Guerra ML, Brandileone MC. [Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of *Streptococcus pneumoniae*]. *J Pediatr (Rio J)* 2003; 79(6):537-42.
- Mayoral C, Norona M, Baroni MR, Giani R, Zalazar F. Evaluation of a nested-PCR assay for *Streptococcus pneumoniae* detection in pediatric patients with community-acquired pneumonia. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37(4):184-8.
- McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, Hakenbeck R, Hryniewicz W, Lefevre JC, Tomasz A, Klugman KP. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7):2565-71.
- Medronho RA, Carvalho, D.M., Bloch, K.V., Luiz, R.R., Werneck, G.L. *Epidemiologia*. 1ª ed. Belo Horizonte: Editora Atheneu; 2003.
- Messina AF, Katz-Gaynor K, Barton T, Ahmad N, Ghaffar F, Rasko D, McCracken GH, Jr. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Dallas, TX, children from 1999 through 2005. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26(6):461-7.
- Miner JR, Heegaard W, Mapes A, Biros M. Presentation, time to antibiotics, and mortality of patients with bacterial meningitis at an urban county medical center. *J Emerg Med* 2001; 21(4):387-92.
- Miranzi Sde S, Moraes SA, Freitas IC. [Trends in *Haemophilus influenzae* type b meningitis in Brazil in children under five years of age from 1983 through 2002]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(5):473-7.
- Murdoch DR, Laing RT, Mills GD, Karalus NC, Town GI, Mirrett S, Reller LB. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10):3495-8.
- Murray PR, Hampton CM. Recovery of pathogenic bacteria from cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1980; 12(4):554-7.
- Musher DM. How contagious are common respiratory tract infections? *N Engl J Med* 2003; 348(13):1256-66.

- Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett, J E, Dolin, R, editor. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 2392-2411.
- Nascimento-Carvalho CN, Freitas-Souza LS, Moreno-Carvalho OA, Alves NN, Caldas RM, Barberino MG, Duarte J, Brandao MA, Mendonca DR, Silva A, Guerra ML, Brandileone MC, Di Fabio JL. [Invasive pneumococcal strains isolated from children and adolescents in Salvador]. J Pediatr (Rio J) 2003; 79(3):209-14.
- Nathan BR. Cerebrospinal fluid and Intracranial pressure. In: Goetz CG, Pappert, E J, editor. Goetz: Textbook of Clinical Neurology. 1 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999. p. 262-7.
- Neeleman C, Klaassen CH, Klomberg DM, de Valk HA, Mouton JW. Pneumolysin is a key factor in misidentification of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and is a putative virulence factor of *S. mitis* and other streptococci. J Clin Microbiol 2004; 42(9):4355-7.
- Nery-Guimaraes R, Bittencourt LC, Pastor MV. [Viral and bacterial meningitis in the municipality of Rio de Janeiro (Brazil). Some considerations on the health information system and the transmission of the disease in an urban area]. Rev Saude Publica 1981; 15(4):379-94.
- Nicoletti C, Brandileone MC, Guerra ML, Levin AS. Prevalence, serotypes, and risk factors for pneumococcal carriage among HIV-infected adults. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57(3):259-65.
- Nigrovic LE, Kuppermann N, McAdam AJ, Malley R. Cerebrospinal latex agglutination fails to contribute to the microbiologic diagnosis of pretreated children with meningitis. Pediatr Infect Dis J 2004; 23(8):786-8.
- Nimri LF, Batchoun R. Community-acquired bacteraemia in a rural area: predominant bacterial species and antibiotic resistance. J Med Microbiol 2004; 53(Pt 10):1045-9.
- Nogueira SA, Fortes, C Q. Infecções do sistema nervoso central. In: Schechter M, Marangoni, D V, editor. Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 252-262.
- Nolte FS, Caliendo, A. Molecular Detection and Identification of Microorganisms. In: Murray PR, Baron, E J, Jorgensen, J H, Pfaller, M A, Tenover, R C, editor. Manual of clinical microbiology. Washington; 2003. p. 234-256.

- Novak R, Henriques B, Charpentier E, Normark S, Tuomanen E. Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 1999; 399(6736):590-3.
- Nuorti JP, Butler JC, Crutcher JM, Guevara R, Welch D, Holder P, Elliott JA. An outbreak of multidrug-resistant pneumococcal pneumonia and bacteremia among unvaccinated nursing home residents. *N Engl J Med* 1998; 338(26):1861-8.
- Nuorti JP, Butler JC, Farley MM, Harrison LH, McGeer A, Kolczak MS, Breiman RF. Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. Active Bacterial Core Surveillance Team. *N Engl J Med* 2000; 342(10):681-9.
- Obregon V, Garcia P, Garcia E, Fenoll A, Lopez R, Garcia JL. Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. *J Clin Microbiol* 2002; 40(7):2545-54.
- O'Halloran D M, Cafferkey MT. Multiplex PCR for identification of seven *Streptococcus pneumoniae* serotypes targeted by a 7-valent conjugate vaccine. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7):3487-90.
- Ostergaard C, Konradsen HB, Samuelsson S. Clinical presentation and prognostic factors of *Streptococcus pneumoniae* meningitis according to the focus of infection. *BMC Infect Dis* 2005; 5:93.
- Parent du Chatelet I, Traore Y, Gessner BD, Antignac A, Naccro B, Njanpop-Lafourcade BM, Ouedraogo MS, Tiendrebeogo SR, Varon E, Taha MK. Bacterial meningitis in Burkina Faso: surveillance using field-based polymerase chain reaction testing. *Clin Infect Dis* 2005; 40(1):17-25.
- Pedro LG, Boente RF, Madureira DJ, Matos JA, Rebelo CM, Igreja RP, Barroso DE. Diagnosis of meningococcal meningitis in Brazil by use of PCR. *Scand J Infect Dis* 2007; 39(1):28-32.
- Perkins MD, Mirrett S, Reller LB. Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. *J Clin Microbiol* 1995; 33(6):1486-91.
- Phongsamart W, Srifeungfung S, Dejsirilert S, Chatsuwat T, Nunthapisud P, Treerathaweeraphong V, Rungnobbhakhun P, Chokeyphaibulkit K. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *S. pneumoniae* causing invasive disease in Thai children younger than 5 years old, 2000-2005. *Vaccine* 2007; 25(7):1275-80.
- Pikis A, Campos JM, Rodriguez WJ, Keith JM. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance, and clinical implications. *J Infect Dis* 2001; 184(5):582-90.

- Pons JL, Mandement MN, Martin E, Lemort C, Nouvellon M, Mallet E, Lemeland JF. Clonal and temporal patterns of nasopharyngeal penicillin-susceptible and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains in children attending a day care center. *J Clin Microbiol* 1996; 34(12):3218-22.
- Proulx N, Frechette D, Toye B, Chan J, Kravcik S. Delays in the administration of antibiotics are associated with mortality from adult acute bacterial meningitis. *Qjm* 2005; 98(4):291-8.
- Radstrom P, Backman A, Qian N, Kraggsbjerg P, Pahlson C, Olcen P. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and streptococci using a seminested PCR strategy. *J Clin Microbiol* 1994; 32(11):2738-44.
- Ragunathan L, Ramsay M, Borrow R, Guiver M, Gray S, Kaczmarski EB. Clinical features, laboratory findings and management of meningococcal meningitis in England and Wales: report of a 1997 survey. *Meningococcal meningitis: 1997 survey report. J Infect* 2000; 40(1):74-9.
- Raymond NJ, Blackmore TK, Humble MW, Jones MR. Bloodstream infections in a secondary and tertiary care hospital setting. *Intern Med J* 2006; 36(12):765-72.
- Raz R, Elhanan G, Shimoni Z, Kitzes R, Rudnicki C, Igra Y, Yinnon A. Pneumococcal bacteremia in hospitalized Israeli adults: epidemiology and resistance to penicillin. Israeli Adult Pneumococcal Bacteremia Group. *Clin Infect Dis* 1997; 24(6):1164-8.
- Rebelo MC, Boente RF, Matos Jde A, Hofer CB, Barroso DE. Assessment of a two-step nucleic acid amplification assay for detection of *Neisseria meningitidis* followed by capsular genogrouping. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(7):809-13.
- Reefhuis J, Honein MA, Whitney CG, Chamany S, Mann EA, Biernath KR, Broder K, Manning S, Avashia S, Victor M, Costa P, Devine O, Graham A, Boyle C. Risk of bacterial meningitis in children with cochlear implants. *N Engl J Med* 2003; 349(5):435-45.
- Reis JN, Cordeiro SM, Coppola SJ, Salgado K, Carvalho MG, Teixeira LM, Thompson TA, Facklam RR, Reis MG, Ko AI. Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1):275-7.
- Ribeiro GS, Lima JB, Reis JN, Gouveia EL, Cordeiro SM, Lobo TS, Pinheiro RM, Ribeiro CT, Neves AB, Salgado K, Silva HR, Reis MG, Ko AI. *Haemophilus influenzae* meningitis 5 years after introduction of the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil. *Vaccine* 2007; 25(22):4420-8.

- Rintamaki S, Saukkoriipi A, Salo P, Takala A, Leinonen M. Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA by using polymerase chain reaction and microwell hybridization with Europium-labelled probes. *J Microbiol Methods* 2002; 50(3):313-8.
- Riordan FA, Cant AJ. When to do a lumbar puncture. *Arch Dis Child* 2002; 87(3):235-7.
- Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, Barrett NL, Pass M, Lexau C, Damaske B, Stefonek K, Barnes B, Patterson J, Zell ER, Schuchat A, Whitney CG. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *Jama* 2001; 285(13):1729-35.
- Rodriguez CA, Atkinson R, Bitar W, Whitney CG, Edwards KM, Mitchell L, Li J, Sublett J, Li CS, Liu T, Chesney PJ, Tuomanen EI. Tolerance to vancomycin in pneumococci: detection with a molecular marker and assessment of clinical impact. *J Infect Dis* 2004; 190(8):1481-7.
- Ross MH, Reith, E J, Rowrell, L J. *Histologia texto e Atlas*. 2 ed. São Paulo: Panamericana; 1993.
- Ruoff KL, Whiley, R A, Beighton, D. *Streptococcus*. In: Murray PR, Baron, E J, Jorgensen, J H, Pfaller, M A, Tenover, R H, editor. *Manual of clinical microbiology*. Washington; 2003. p. 405-421.
- Saha SK, Darmstadt GL, Yamanaka N, Billal DS, Nasreen T, Islam M, Hamer DH. Rapid diagnosis of pneumococcal meningitis: implications for treatment and measuring disease burden. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24(12):1093-8.
- Salo P, Ortqvist A, Leinonen M. Diagnosis of bacteremic pneumococcal pneumonia by amplification of pneumolysin gene fragment in serum. *J Infect Dis* 1995; 171(2):479-82.
- Samra Z, Shmueli H, Nahum E, Paghis D, Ben-Ari J. Use of the NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45(4):237-40.
- Saravolatz LD, Manzor O, VanderVelde N, Pawlak J, Belian B. Broad-range bacterial polymerase chain reaction for early detection of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 2003; 36(1):40-5.
- Saukkoriipi A, Palmu A, Kilpi T, Leinonen M. Real-time quantitative PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in the middle ear fluid of children with acute otitis media. *Mol Cell Probes* 2002; 16(5):385-90.

- Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, van Zwet AA. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2):734-40.
- Shimada J, Yamanaka N, Hotomi M, Suzumoto M, Sakai A, Ubukata K, Mitsuda T, Yokota S, Faden H. Household transmission of *Streptococcus pneumoniae* among siblings with acute otitis media. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5):1851-3.
- Sidikou F, Djibo S, Taha MK, Alonso JM, Djibo A, Kairo KK, Chanteau S, Boisier P. Polymerase chain reaction assay and bacterial meningitis surveillance in remote areas, Niger. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(11):1486-8.
- Sleeman KL, Daniels L, Gardiner M, Griffiths D, Deeks JJ, Dagan R, Gupta S, Moxon ER, Peto TE, Crook DW. Acquisition of *Streptococcus pneumoniae* and nonspecific morbidity in infants and their families: a cohort study. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24(2):121-7.
- Sleeman KL, Griffiths D, Shackley F, Diggle L, Gupta S, Maiden MC, Moxon ER, Crook DW, Peto TE. Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. *J Infect Dis* 2006; 194(5):682-8.
- Smith K, Diggle MA, Clarke SC. Automation of a fluorescence-based multiplex PCR for the laboratory confirmation of common bacterial pathogens. *J Med Microbiol* 2004; 53(Pt 2):115-7.
- Spanos A, Harrell FE, Jr., Durack DT. Differential diagnosis of acute meningitis. An analysis of the predictive value of initial observations. *Jama* 1989; 262(19):2700-7.
- SSI. Pneumococcal group antisera. Disponível em <<http://www.ssi.dk/sw1368.asp>>. Acesso em 21/07/2007.
- SSI. Pneumococcal type antisera. Disponível em <<http://www.ssi.dk/sw1369.asp>>. Acesso em 21/07/2007.
- Steele RW, Marmer DJ, O'Brien MD, Tyson ST, Steele CR. Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1986; 23(5):965-6.
- Taha MK, Alonso JM, Cafferkey M, Caugant DA, Clarke SC, Diggle MA, Fox A, Frosch M, Gray SJ, Guiver M, Heuberger S, Kalmusova J, Kesanopoulos K, Klem AM, Kriz P, Marsh J, Molling P, Murphy K, Olcen P, Sanou O, Tzanakaki G, Vogel U. Interlaboratory comparison of PCR-based identification and genogrouping of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1):144-9.

- Tan TQ, Mason EO, Jr., Wald ER, Barson WJ, Schutze GE, Bradley JS, Givner LB, Yogev R, Kim KS, Kaplan SL. Clinical characteristics of children with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatrics* 2002; 110(1 Pt 1):1-6.
- Tarafdar K, Rao S, Recco RA, Zaman MM. Lack of sensitivity of the latex agglutination test to detect bacterial antigen in the cerebrospinal fluid of patients with culture-negative meningitis. *Clin Infect Dis* 2001; 33(3):406-8.
- Tavares W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2001.
- Thomson RB, Jr., Bertram H. Laboratory diagnosis of central nervous system infections. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15(4):1047-71.
- Thomson RB, Miller Jr, J M. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Murray PR, Baron, E J, Jorgensen, J H, Pfaller, M A, Tenover, R H, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington; 2003. p. 286-330.
- Trajman A, Luiz RR. McNemar Chi-Square test revisited: comparing sensitivity and specificity of diagnostic examinations. *Scand J Clin Lab Invest in press*.
- Tsuda Y, Sakoda Y, Sakabe S, Mochizuki T, Namba Y, Kida H. Development of an immunochromatographic kit for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Microbiol Immunol* 2007; 51(9):903-7.
- Tunkel AR. Approach to the patient with central nervous system infection. In: Mandell GL, Bennett, J E, Dolin, R, editor. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005a. p. 1079-1082.
- Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley RJ. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 2004; 39(9):1267-84.
- Tunkel AR, Scheld, W M. Acute meningitis. In: Mandell GL, Bennett, J E, Dolin, R, editor. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005b. p. 1083-1126.
- Tzanakaki G, Tsopanomalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumala M, Tabaki A, Kremastinou J. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(5):386-90.

- Uzuka R, Kawashima H, Hasegawa D, Ioi H, Amaha M, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Chiba K. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by using multiplex PCR and real time PCR. *Pediatr Int* 2004; 46(5):551-4.
- van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2004; 351(18):1849-59.
- van de Beek D, Schmand B, de Gans J, Weisfelt M, Vaessen H, Dankert J, Vermeulen M. Cognitive impairment in adults with good recovery after bacterial meningitis. *J Infect Dis* 2002; 186(7):1047-52.
- Van Gastel E, Bruynseels P, Verstrepen W, Mertens A. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of pneumococcal and meningococcal meningitis in a tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26(9):651-3.
- van Ginkel FW, McGhee JR, Watt JM, Campos-Torres A, Parish LA, Briles DE. Pneumococcal carriage results in ganglioside-mediated olfactory tissue infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(24):14363-7.
- van Haeften R, Palladino S, Kay I, Keil T, Heath C, Waterer GW. A quantitative LightCycler PCR to detect *Streptococcus pneumoniae* in blood and CSF. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47(2):407-14.
- Vieira AC, Gomes MC, Rolo Filho M, Eudes Filho J, Bello EJ, de Figueiredo RB. *Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83(1):71-8.
- Virolainen A, Salo P, Jero J, Karma P, Eskola J, Leinonen M. Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumoniae* in middle ear fluid of children with acute otitis media. *J Clin Microbiol* 1994; 32(11):2667-70.
- Walker JA, Allen RL, Falmagne P, Johnson MK, Boulnois GJ. Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1987; 55(5):1184-9.
- Watt JP, O'Brien KL, Benin AL, McCoy SI, Donaldson CM, Reid R, Schuchat A, Zell ER, Hochman M, Santosham M, Whitney CG. Risk factors for invasive pneumococcal disease among Navajo adults. *Am J Epidemiol* 2007; 166(9):1080-7.
- Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, de Gans J. Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. *Lancet Neurol* 2006; 5(2):123-9.

- Welinder-Olsson C, Dotevall L, Hogevik H, Jungnelius R, Trollfors B, Wahl M, Larsson P. Comparison of broad-range bacterial PCR and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of community-acquired bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(9):879-86.
- Whatmore AM, King SJ, Doherty NC, Sturgeon D, Chanter N, Dowson CG. Molecular characterization of equine isolates of *Streptococcus pneumoniae*: natural disruption of genes encoding the virulence factors pneumolysin and autolysin. *Infect Immun* 1999; 67(6):2776-82.
- White B. History of pneumococcus. In: White B, editor. *The biology of pneumococcus*. 1 ed. New York: The Commonwealth Fund; 1938. p. 1-29.
- Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, Reingold A, Cieslak PR, Pilishvili T, Jackson D, Facklam RR, Jorgensen JH, Schuchat A. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med* 2003; 348(18):1737-46.
- WHO. Epidemic meningococcal disease. In: WHO Fact Sheet 105. Geneva: World Health Organization; 1998.
- WHO. WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. In. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003. p. viii; 51.
- Winn Jr. W, Allen, S, Janda, W, Koneman, E, Procop, G, Schereckenberger, P, Woods, G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- Yaro S, Lourd M, Traore Y, Njanpop-Lafourcade BM, Sawadogo A, Sangare L, Hien A, Ouedraogo MS, Sanou O, Parent du Chatelet I, Koeck JL, Gessner BD. Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis epidemic in Burkina Faso. *Clin Infect Dis* 2006; 43(6):693-700.

ANEXOS

Anexo 1**FICHA DE COLETA DE DADOS – PROJETO PCR**

Paciente: _____

Idade: _____ anos _____ meses Sexo: M () F ()

Município: _____ Estado: _____

Diagnóstico clínico: _____

Petéquias: sim () não ()

Prontuário: _____

Data da coleta: ____/____/____ Data de entrada no laboratório: ____/____/____

Registro Laboratório: _____

Espécime Clínico: LCR () Sangue () Soro () Plasma () Líquido pleural ()
Líquido sinovial () Líquido pericárdico ()

Exame do LCR:

Aspecto: claro () turvo () purulento () hemorrágico ()

Celularidade _____ mm³ PMN _____% Glicose _____ mg% Ptn _____ mg%

Bacterioscopia _____ Teste do Látex _____

Cultura de LCR: _____

Hemocultura: _____

Uso prévio de atb: () sim () não

Tempo decorrido entre o início do ATB e a punção lombar (horas): _____

Anexo 2

Regiões do Estado do Rio de Janeiro segundo o Plano Diretor de Regionalização do Estado (fonte: <http://www.saude.rj.gov.br/gestor/regionalizacao.shtml> acessado em 14/06/2006)

Baía de Ilha Grande (**BIG**)

Baixada Litorânea (**BL**)

Centro Sul (**CS**)

Médio Paraíba (**MP**)

Metropolitana I (**MT1**)

Metropolitana II (**MT2**)

Noroeste (**NO**)

Norte (**N**)

Serrana (**S**)

Total: 92 municípios

14.367.083 habitantes pelo Censo de 2001 (IBGE)

BIG: Angra dos Reis/Mangaratiba/Paraty

BL: Araruama/Armação de Búzios/Arraial do Cabo/Cabo Frio/Casimiro de Abreu/Iguaba Grande/Rio das Ostras/São Pedro d'Aldeia/Saquarema

CS: Areal/Comendador Levy Gasparian/Engenheiro Paulo de Frontein/Mendes/Miguel Pereira/Paraíba do Sul/Paty do Alferes/Sapucaia/Três Rios/Vassouras/Paracambi

MP: Barra do Piraí/Barra Mansa/Itatiaia/Pinheiral/Piraí/Porto

Real/Quatis/Resende/Rio Claro/Rio das Flores/Valença/Volta Redonda

MT1: microrregião 1- Rio de Janeiro (**RJ**); demais microrregiões: Belford Roxo/Duque de Caxias/Itaguaí/Japeri/Magé/Mesquita/Nilópolis/Nova Iguaçu/Queimados/São João de Meriti/Seropédica

MT2: Itaboraí/Maricá/Niterói/Rio Bonito/São Gonçalo/Silva Jardim/Tanguá

NO: Aperibé/Bom Jesus de Itabapoana/Cambuci/Cardoso

Moreira/Italva/Itaocara/Itaperuna/Laje do

Muriaé/Miracema/Natividade/Porciúncula/Santo Antônio de Pádua/São José de Ubá/Varre Sai

N: Campos dos Goytacazes/Carapebus/Conceição de

Macabu/Macaé/Quassimã/São Fidélis/São Francisco de Itabapoana/São João da Barra

S: Bom Jardim/Cantagalo/Carmo/Cordeiro/Cachoeiras de Macacu/Duas

Barras/Guapimirim/Macuco/Nova Friburgo/Petrópolis/Santa Maria Madalena/São

João do Vale do Rio Preto/São Sebastião do Alto/Sumidouro/Teresópolis/Trajano de Morais

Anexo 3 - Artigo Publicado

Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* meningitis by polymerase chain reaction amplification of the gene for pneumolysin

Juliana de A Matos/*, Danielle J Madureira, Maria C Rebelo**, Cristina B Hofer*, David E Barroso/+

Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil **Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Diagnosis of bacterial meningitis has long been based on classical methods of Gram stain, serological tests, and culture of cerebrospinal fluid (CSF). The performance of these methods, especially culture and direct smear, is thwarted by failure to detect bacteria following administration of antimicrobial agents and reluctance to perform lumbar punctures at admission. Indeed, patients with meningitis frequently receive antibiotics orally or by injection before the diagnosis is suspected or established. Thus an alternative method has become necessary to help clinicians and epidemiologists to management and control of bacterial meningitis. We evaluate the application of a polymerase chain reaction-based (PCR) assay for amplification of pneumolysin gene (ply) to diagnosis of Streptococcus pneumoniae meningitis. The PCR assay sensitivity for CSF was 96% (95% confidence interval, CI, 90-99%) compared to a sensitivity of 59% for culture (95% CI 49-69%), 66% for Gram stain (95% CI 56-74%), and 78% for latex agglutination test (95% CI 69-86%); PCR specificity was 100% (95% CI 83-100%). PCR results were available within 4 h of the start of the assay. This molecular approach proved to be reliable and useful to identify this bacterium compared with other classical laboratory methods for identification of bacterial meningitis pathogens.

Key words: *Streptococcus pneumoniae* - meningitis - polymerase chain reaction - pneumolysin ply gene

Community-acquired bacterial meningitis is one of the most dramatic medical emergencies, which is seen as a public health challenge world-wide. The disease is dreaded by parents and health care workers alike for its acute onset in previously healthy individuals and the difficulty in obtaining a timely and accurate diagnosis. Although the two main agents of acute bacterial meningitis in the community, *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*, are responsive to antibiotic therapy, these diagnosis challenges of the disease pose a particular problem for treatment (Ragunathan et al. 2000, Heyderman et al. 2003, Makwana et al. 2004). *S. pneumoniae* meningitis is associated with a poor outcome due to a greater case-fatality rate and a higher probability of survivors develop permanent neurological sequelae when compared to other agents (Crook & Spratt 1998, Heyderman et al. 2003, Parent du Chatelet et al. 2005). An additional problem is an increase in the incidence of multiple antibiotic resistance in *S. pneumoniae* and recent emergence of strains with potential to cause epidemic of meningitis resembling *N. meningitidis* epidemics into the African meningitis belt (Crook & Spratt 1998, Leimkugel et al. 2005, Parent du Chatelet et al. 2005).

The *Haemophilus influenzae* type b (Hib) conjugated vaccine was introduced in the public immunization program in 1999 by the State Health Department, which expanded vaccine coverage to all the population living in

Rio de Janeiro, Southeast of Brazil. A dramatic reduction in Hib meningitis cases has been documented during the following years; consequently *N. meningitidis* and *S. pneumoniae* became the two major causes of bacterial meningitis beyond the neonatal period notified to local health authorities. Since the beginning of the XXI century, *S. pneumoniae* is the etiology of about 60 new confirmed cases of meningitis annually in the city of Rio de Janeiro, a rate of 1.2/100,000 population; 22 (37%) of these cases die and the number of survivors who develop permanent neurological sequelae is unknown (Rio de Janeiro City Health Department).

Preadmission parenteral antibiotic has been widely recommended as a significant strategy to improve patient prognosis whenever the diagnosis of bacterial meningitis is suspected, particularly if lumbar puncture is not thought safe (Cartwright et al. 1992, Riordan & Cant 2002). The recommendation of early antibiotic therapy has been strongly advised to assistant physicians during the 1990s for suspected cases of meningococcal disease or acute bacterial meningitis (Heyderman et al. 2003, Makwana & Riordan 2004); thus a reduction in the proportion of confirmed cases by culture, direct smear or latex agglutination test was expected (Dalton & Allison 1968, Feldman 1978, Kanegaye et al. 2001, Nigrovic et al. 2004). The consequence has significant medical, epidemiological, and diagnostic implications. Since the mid of the 1990s local consultants in communicable diseases have reported an increase on the number of non-culture proven bacterial meningitis cases (Rio de Janeiro City Health Department). The increasing practice of preadmission administration of parenteral antibiotic therapy and reluctance to perform lumbar punctures at admission are pointed out to contribute to a decrease of confirmed cases in several countries,

+Corresponding author: barroso@ioc.fiocruz.br

Received 20 February 2006

Accepted 21 June 2006

especially by the failure to isolate bacteria (Cartwright et al. 1992, Ragunathan et al. 2000, Corless et al. 2001, Kanegaye et al. 2001, Riordan & Cant 2002, Nigrovic et al. 2004). An alternative approach is nucleic acid amplification assays because antibiotics do not act as an inhibitor of the reaction (Cartwright et al. 1992, Borrow et al. 1997, Ragunathan et al. 2000, Rintamäki et al. 2002, Clarke & Edwards 2003).

Target pneumolysin (*ply*) gene was investigated for identification of *S. pneumoniae* in clinical specimens from infected patients with otitis media, pneumonia or meningitis (Virolaine et al. 1994, Salo et al. 1995, Rintamäki et al. 2002, Corless et al. 2001, Clarke & Edwards 2003). Pneumolysin is a species-specific sulfhydryl-activated protein toxin produced intracellularly by all *S. pneumoniae* isolated from clinical samples, regardless the capsule antigen (serotype) (Walker et al. 1987). This pore-forming cytolysin discovered 100 years ago can be thought of as a key virulence factor following pneumococcal invasive infection (Libman 1905, Hirst et al. 2004). These features of pneumolysin turn the *ply* gene to be an attractive target for molecular diagnosis of *S. pneumoniae* invasive disease (Hirst et al. 2004, Messmer et al. 2004). The aim of this article is to assess the use and effectiveness of a polymerase chain reaction (PCR) assay to detect *S. pneumoniae* in cerebrospinal fluid (CSF) samples from meningitis patients collected and transported using the local field conditions, compared with other classical laboratory diagnostic methods for the identification of bacterial meningitis pathogens.

MATERIALS AND METHODS

Setting, study design, and case definition - This study took place at the Instituto Oswaldo Cruz, in the city of Rio de Janeiro, between 2004 and 2005. We conducted this study to evaluate the PCR assay to diagnosis *S. pneumoniae* in CSF from patients with clinically diagnosed bacterial meningitis with etiologic source identified by a traditional laboratory method. In this study cases were defined by the presence of one of the following criteria: (i) isolation of *S. pneumoniae* from CSF; (ii) detection of pneumococcal capsule antigens in CSF by means of latex agglutination test; or (iii) identification of Gram-positive diplococci in a Gram stain CSF smear.

Samples - All samples of CSF were processed for culture, cytological examination, biochemical reaction, latex agglutination test, Gram stain, and stored at -20°C in the Reference Laboratory of the State Meningitis Reference Centre, Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião (IEISS), in the city of Rio de Janeiro, the Capital of the state of Rio de Janeiro. The reference laboratory obtains the samples, collected inside sterile glass vials, from patients admitted in the IEISS and it also receives them from other hospitals, mainly in the Rio de Janeiro metropolitan area. Sample delivery to the reference laboratory seldom is in adequate conditions at 4°C (on wet ice or chilly pad) from other hospitals. Frequently CSF samples come at room temperature (T_{h}) in the first 24 h or even 1-2 days after lumbar puncture is done. So the PCR assay has to prove to work satisfactorily without ideal conditions of storage and transport before it reaches the reference laboratory.

We have received 106 CSF samples from *S. pneumoniae* confirmed meningitis patients by one of the criteria for case definition presented above. The characteristics of these CSF samples studied are shown in Table I. CSF samples from patients with clinically diagnosed bacterial meningitis caused by other bacteria, identified as *S. agalactiae* ($n = 6$), *M. tuberculosis* ($n = 4$), *L. monocytogenes* ($n = 2$), *S. aureus* ($n = 1$), *A. baumannii* ($n = 2$), *H. influenzae* type b ($n = 1$), and *N. meningitidis* serogroups B, C, W₁₃₅ or Y ($n = 4$) were used as controls. The bacterial DNA from the CSF sample was isolated with the use of DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol for DNA purification from Gram-positive bacteria.

PCR assay - To identify *S. pneumoniae* was performed a PCR amplification of the *ply* gene with specific oligonucleotide primers (Forward: TGCAGAGCGTCC TTTGGTCTAT; Reverse: CTCTTACTCGTGGTTT CCAACTTGA) designed by Corless et al. (2001) based on previously published gene sequences (Walker et al. 1987), for which the amplicon size was 80 bp. PCR reaction mixture (50 μl) contained 0.6 μM of each oligonucleotide primer (Invitrogen), 200 μM dNTPs, 1X PCR buffer, 3 mM MgCl_2 , 1U Platinun *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), and 10 μl of DNA target. The PCR assays were performed in a DNA thermal cycler (GeneAmp PCR

TABLE I
Characteristics of 106 cerebrospinal fluid samples from positive cases

<i>Streptococcus pneumoniae</i> detected by			Total number of samples	Number (%) of samples positive by polymerase chain reaction
Culture	Antigen detection	Gram stain		
+	+	+	36	34 (94)
+	+	-	9	9 (100)
+	-	+	7	6 (86)
+	-	-	11	11 (100)
-	+	+	22	21 (95)
-	+	-	16	16 (100)
-	-	+	5	5 (100)

+: positive test; -: negative test.

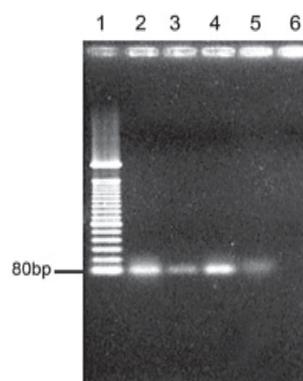
System 9700, PE Applied Biosystems) with the following conditions: 94°C for 3 min, 55°C for 30 s, 72°C for 20 s (initial cycle); followed by subsequent 35 cycles of 92°C for 40 s; 55°C for 30 s, 72°C for 20 s (denaturation, annealing, and polymerization, respectively); and 72°C for 10 min (final cycle of polymerization). Amplicons were analyzed by electrophoresis on a standard 2% agarose gel under UV fluorescence following staining with ethidium bromide. It was included in each assay the DNA from *S. pneumoniae* (ATCC 49619) as positive control and the reaction mixture without DNA target as negative control.

Accuracy of test result - Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were calculated using a two-way table (Epi Info™, Version 3.3.2, CDC). The chi-square with Yates correction was used to analysis the differences between proportions. Exact binomial 95% confidence intervals (CI) were estimated. The sensitivity of the PCR was determined using CSF from positive cases (culture or antigen detection or direct smear) corresponded to criteria i (n = 63), ii (n = 83), and iii (n = 70). To determine the specificity, amplification reactions were carried out using genomic DNA extracted (DNeasy Tissue Kit, Quiagen) from *N. meningitidis* (ATCC 13090), *H. influenzae* (ATCC 49766), *H. influenzae* type b (ATCC 10211), *S. aureus* (ATCC 29213), *S. agalactiae* (clinical isolate), and *E. faecalis* (clinical isolate). It was also examined CSF samples from patients corresponded to bacterial meningitis other than pneumococcal (n = 20).

RESULTS

Of the 106 patients with pneumococcal meningitis, 25% were infants (mean of 5 months) and 16% were over 50 years. The median age was 30 years (range, 1 month to 75 years). Sixty-one (58%) patients were female and 45 (42%) were male ($\chi^2 = 4.8, P = 0.03$).

The mean of CSF white blood cell count was 3756/mm³ (range, 1 to 48,800/mm³); 23% had less than 100/mm³ and 9% less than 15/mm³. Of the total, 102 samples from positive cases were correctly identified by means of PCR, whereas antigen detection was positive in 83, direct smear revealed organisms in 70, and only 63 isolates cultured from CSF. The amplicon of *ply* gene amplified from positive control (ATCC 49619) and three CSF samples from each positive case assigned only to one of the valid criteria in this study (culture, antigen detection, and direct smear) are shown in Fig. 1. PCR failed to amplify the *ply* target in three culture proven-cases and one non-culture



Polymerase chain reaction amplification of the *ply* gene from a reference *Streptococcus pneumoniae* strain and from cerebrospinal fluid (CSF) samples from pneumococcal meningitis confirmed cases. 1: molecular weight marker; 2: reference strain (ATCC 49619); 3: culture-positive CSF sample; 4: antigen detection-positive CSF sample; 5: Gram stain-positive CSF sample; 6: negative control.

proven-case solely based on antigen detection and Gram stain. There was no false-positive result. All CSF samples from bacterial meningitis other than pneumococcal were negative by PCR for the presence of *S. pneumoniae* DNA.

The specificity of the assay was tested with DNA purified from four standard strains and two clinical isolates. No products were amplified from these genomic DNA but amplification of gene target was successful with DNA from *S. pneumoniae* standard strain. The sensitivity of the nucleic acid based amplification assay was evaluated with data from positive cases (culture or antigen detection or Gram stain). Sensitivity (96, 95 CI 90-99%), specificity (100, 95 CI 83-100%), positive predictive value (100, 95 CI 96-100%), and negative predictive value (86, 95 CI 67-96%) were calculated and compared with results obtained with classical laboratory diagnostic methods (Table II).

DISCUSSION

Diagnosis of bacterial meningitis is formerly founded on a suggestive clinical scenario, although it is the CSF white blood cell count that establishes the definitive diagnosis. The identification of bacterial meningitis etiologies is based on traditional laboratory diagnostic methods of culture, Gram stain, and serological tests (Ragunathan et al. 2000). All these diagnosis steps are hindered

TABLE II

Accuracy of polymerase chain reaction (PCR), culture, Gram stain, latex agglutination test of cerebrospinal fluid results for diagnosis of pneumococcal meningitis in 106 infected patients

Procedure	No. of samples		Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
	+	-				
PCR	102	4	96	100	100	86
Culture	63	43	59	100	100	37
Gram stain	70	36	66	100	100	41
Antigen detection	83	23	78	100	100	52

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

by the alteration of CSF findings, the failure to isolate bacteria, and a reduced identification of the organism on Gram stain CSF smear following administration of antibiotics (Dalton & Allison 1968, Rangunathan et al. 2000, Kanegaye et al. 2001, Riordan & Cant 2002, Nigrovic et al. 2004). Truly, a small but perplexing group of patients with bacterial meningitis in whom preliminary antibiotic therapy alters the CSF findings to the degree that is difficult to distinguish acute bacterial meningitis from viral aseptic meningitis or encephalitis, enhancing the possibility of diagnostic error. The reduction in bacterial concentration following preliminary antibiotic treatment for *S. pneumoniae* decreases the diagnostic effectiveness of the Gram stain and CSF culture (Feldman 1978, Rangunathan et al. 2000, Kanegaye et al. 2001). The results expected by means of latex agglutination test do not alter after the parenteral administration of antibiotics, but in some instance a decrease in the sensitivity of this test can be explained by the time relationship between onset of the specific treatment and when the lumbar puncture is done (Nigrovic et al. 2004).

Lumbar puncture is commonly postponed at admission in the most severe cases or prior brain image evaluation in immunocompromised patient or in the presence of specific neurological signals (Riordan & Cant 2002). Nevertheless, CSF samples obtained at a delayed lumbar puncture, because patient conditions are unstable, can be assayed by means of PCR to properly detect gene target with good sensitivity (Borrow et al. 1997, Riordan & Cant 2002). In one study it could be demonstrated the detection of bacterial DNA by PCR in CSF samples taken up to 72 h after commencement of antibiotics (Rangunathan et al. 2000).

In this report the PCR has demonstrated a highly specific and sensitive approach to identify *S. pneumoniae* in infected patients through the detection of *ply* target compared with culture, Gram stain and latex agglutination test. PCR-based assays have provided useful epidemiological information on the detection and characterization of bacterial meningitis pathogens with a greater sensitivity than culture or direct smear, with excellent specificity (Borrow et al. 1997, Clarke & Edwards 2003).

The application of the PCR protocol presented in this study has been effective in the detection of *S. pneumoniae* from CSF and represents an efficient approach to enhanced surveillance of bacterial meningitis. Although the *ply* PCR alone may appear sufficient as a screening assay and supports the diagnosis, it is considered prudent to take into account the possibility of discrepant results. PCR like any sampling technique does not solve all diagnostic problems such as the negative results in four positive cases. The failure of PCR in these CSF samples possibly is due to the presence of a substance inhibitory for the reaction. Although less likely, another possible explanation for this result would be inadequate conditions of collection and transport. The presence of PCR inhibitory factors could be greatly reduced when bacterial DNA is isolated upon receipt and it also concentrates the DNA present in the sample (Clarke & Edwards 2003).

The PCR assays have been applied with success to enhance surveillance of bacterial meningitis in remote ar-

reas in Africa, where conditions of collection and transport is not always adequate (Sidikou et al. 2003, Parent du Chatelet et al. 2005). The absence of reliable laboratories for culture and strain identification of the most common etiologic sources of bacterial meningitis into the vast territory of Brazil, impede microbiological surveillance outside the urban areas. It should be pointed out that in several remote areas like the Amazon region, even in the capitals poor transport infrastructure, human resources, and lack of microbiology laboratories are critical problems for community health. It is possible to store unclotted blood samples at room T_h for 1 to 5 days when PCR assay is desired without loss of sensitivity (Kaczmarek & Cartwright 1995). In this study, we validated the *ply* PCR with CSF specimens kept at room T_h for a while or refrigerated at 4°C for some days with compared sensitivity and specificity of results obtained in ideal conditions of collection and transport (Rintamäki et al. 2002, Clarke & Edwards 2003, Messmer et al. 2004). Once this point can be overcome the benefits of PCR-based surveillance of bacterial meningitis in Brazil is clear. The conditions to collect and store fresh CSF specimens are simple and can be implemented at a low cost through a coordination of the Ministry of Health.

Despite advances in real-time PCR technology, this method is expensive and its routine use is restricted (Corless et al. 2001); thus the introduction of such technique in local public health laboratories in Brazil seems to be remote. The PCR assay presented here appears as a satisfactory solution to be implemented at a central level into the reference laboratories (Lacen) located in each state, where the laboratory diagnostic procedures for most infectious diseases are concentrated. The method is simple, easy to carry out, and able to provide specific strain identification in a few hours. Once the DNA is ready to use, the PCR protocol described in this article can be performed rapidly with a turnaround time of 4 h of the start of the assays. The time from the initiation of DNA extraction to the issuing of a report can be shortened when samples are subjected to freeze-thaw, 100°C heat, and then centrifugation to obtain non-purified DNA for PCR.

The accuracy of the test compared with the three other laboratory procedures provided evidences the PCR assay has a better diagnostic performance, with which the surveillance of bacterial meningitis can be improved. Nucleic acid based amplification methods have inherent high sensitivity and it plays an important part in the non-culture diagnosis of bacterial meningitis due to its ability to detect DNA from non-culturable bacteria killed by physical or antimicrobial agents. Consequently, the PCR technique should be considered the diagnostic gold standard for positive cases, based on the data presented in this study and those previously published (Virolainen et al. 1994, Salo et al. 1995, Rangunathan et al. 2000, Corless et al. 2001, Rintamäki et al. 2002, Sidikou et al. 2003, Clarke & Edwards 2003, Messmer et al. 2004, Parent du Chatelet et al. 2005).

The routine use of this molecular diagnostic technique shall increase laboratory-confirmed cases of meningitis-causing *S. pneumoniae* over that with culture. It has been proved in countries without reliable microbiology labora-

tories the introduction of PCR-based assays demonstrated pneumococcal meningitis cases had been underestimated (Parent du Chatelet et al. 2005). It is important to point out, that according to the guidance for meningitis surveillance provided by the Brazilian Ministry of Health, the presence of Gram-positive diplococci in a Gram stain CSF smear alone is not a valid criteria for case definition of pneumococcal meningitis (G00.1, ISCD-10), and the use of PCR in this scenario would enhance the surveillance of this pathogen (Fundação Nacional de Saúde 2002). Nevertheless nucleic acid based amplification assays should not be developed as an alternative approach to culture as it gives information on antibiotic resistance and serotype.

REFERENCES

- Borrow R, Claus H, Guiver M, Smart L, Jones DM, Kaczmarek EB, Frosch M, Fox AJ 1997. Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialyltransferase (*siaD*) PCR ELISA. *Epidemiol Infect* 118: 111-117.
- Cartwright K, Reilly S, White D, Stuart J 1992. Early treatment with parenteral penicillin in meningococcal disease. *BMJ* 305: 143-147.
- Clarke SC, Edwards GFS 2003. Guidance for requests and interpretation of services provided by the Scottish Meningococcus and Pneumococcus Reference Laboratory. *SCIEH Weekly Report* 37: 1-6.
- Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB 2001. Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 39: 1553-1558.
- Crook DWM, Spratt BG 1998. Multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Brit Med Bull* 54: 595-610.
- Dalton HP, Allison MJ 1968. Modification of laboratory results by partial treatment of bacterial meningitis. *Am J Clin Pathol* 49: 410-413.
- Feldman WE 1978. Effect of prior antibiotic therapy on concentrations of bacteria in CSF. *Am J Dis Child* 132: 672-674.
- Fundação Nacional de Saúde 2002. *Meningite por Pneumococo. Guia de Vigilância Epidemiológica*, Ministério da Saúde, Brasília, p. 621-632.
- Heyderman RS, Lambert HP, O'Sullivan I, Stuart JM, Taylor BL, Wall RA 2003. Early management of suspected bacterial meningitis and meningococcal septicaemia in adults. *J Infect* 46: 75-77.
- Hirst RA, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW 2004. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol* 138: 195-201.
- Kanegaye JT, Solimanzadeh P, Bradley JS 2001. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. *Pediatrics* 108: 1169-1174.
- Kaczmarek EB, Cartwright KA 1995. Control of meningococcal disease: guidance for microbiologists. *Commun Dis Rep Rev* 5: R196-198.
- Leimkugel J, Forgor AA, Gagneux S, Pflüger V, Flierl C, Awine E, Naegeli M, Dangy J-P, Smith T, Hodgson A, Pluschke G 2005. An outbreak of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* meningitis in northern Ghana with features that are characteristic of *Neisseria meningitidis* meningitis epidemics. *J Infect Dis* 192: 192-199.
- Libman E 1905. A pneumococcus producing a peculiar form of hemolysis. *Proc NY Pathol Soc* 5: 168.
- Makwana M, Nye K, Riordan FAI 2004. Meningitis without a petechial rash in children in the Hib vaccine era. *J Infect* 49: 297-301.
- Messmer TO, Sampson JS, Stinson A, Wong B, Carlone GM, Facklam RR 2004. Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 49: 249-254.
- Nigrovic LE, Kuppermann N, McAdam AJ, Malley R 2004. Cerebrospinal latex agglutination fails to contribute to the microbiologic diagnosis of pretreated children with meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 23: 786-788.
- Parent du Chatelet I, Traore Y, Gessner BD, Antignac A, Nacro B, Njanpop-Lafourcade BM, Ouedraogo MS, Tiendrebeogo SR, Varon E, Taha MK 2005. Bacterial meningitis in Burkina Faso: surveillance using field-based polymerase chain reaction testing. *Clin Infect Dis* 40: 17-25.
- Ragunathan L, Ramsay M, Borrow R, Guiver M, Gray S, Kaczmarek E 2000. Clinical features, laboratory findings, and management of meningococcal meningitis in England and Wales: report of 1997 survey. *J Infect* 40: 74-79.
- Rintamäki S, Saukkoriipi A, Salo P, Takala A, Leinonen M 2002. Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA by using polymerase chain reaction and microwell hybridization with Europium-labelled probes. *J Microbiol Meth* 50: 313-318.
- Riordan FAI, Cant AJ 2002. When to do a lumbar puncture. *Arch Dis Child* 87: 235-237.
- Salo P, Ortqvist A, Leinonen M 1995. Diagnosis of bacteremic pneumococcal pneumonia by amplification of pneumolysin gene fragment in serum. *J Infect Dis* 171: 479-482.
- Sidikou F, Djibo S, Taha MK, Alonso JM, Djibo A, Kairo KK, Chanteau S, Boissier P 2003. Polymerase chain reaction assay and bacterial meningitis surveillance in remote areas, Niger. *Emerg Infect Dis* 9: 1486-1488.
- Virolainen A, Salo P, Jero J, Karma P, Eskola J, Leinonen M 1994. Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumoniae* in middle ear fluid of children with acute otitis media. *J Clin Microbiol* 32: 2667-2670.
- Walker, JA, Allen RL, Falmagne P, Johnson MK, Boulnois GJ 1987. Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 55: 1184-1189.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)