

AC&T- ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANÁLISES LABORATORIAIS
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO LATU SENSU EM MICROBIOLOGIA
CLÍNICA

DANIELA SCHNEIDER XAVIER

O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MENINGITE BACTERIANA POR
***Streptococcus pneumoniae*: MÉTODOS CONVENCIONAIS, NÃO**
CONVENCIONAIS E BIOLOGIA MOLECULAR.

São Jose do Rio Preto – SP

2015

O diagnóstico laboratorial da meningite bacteriana por *Streptococcus pneumoniae*: métodos convencionais, automatizados e biologia molecular.

RESUMO

A meningite bacteriana pelo *Streptococcus pneumoniae* ainda é um grande desafio para a saúde pública, pois a doença tem uma alta taxa de morbidade e, quando os pacientes sobrevivem, podem ter sequelas no sistema nervoso central devido os mecanismos de virulência deste patógeno. Além disso, em países em desenvolvimento, os métodos de detecção em amostras de LCR ainda é deficiente, visto que muitos laboratórios de análises clínicas ainda não possuem recursos suficientes para o diagnóstico rápido e preciso para garantir uma profilaxia imediata. Muitos ainda dispõem somente dos métodos convencionais de cultura, que dependem de outros fatores pré-analíticos como coleta e transporte adequados da amostra, bem como o uso prévio de antibióticos pelo paciente. O presente estudo visa abordar os aspectos epidemiológicos, diagnóstico laboratorial convencionais e não convencionais, como técnicas de biologia molecular e sua especificidade. Para tanto, a metodologia de pesquisa utilizada foi o levantamento bibliográfico de caráter exploratório e análise qualitativa. A partir dos resultados obtidos, verificou-se um melhor desempenho de técnicas de biologia molecular frente a técnicas convencionais, embora ainda a maioria deles continua sendo utilizadas somente para estudos epidemiológicos e melhoria de técnicas já utilizadas.

Palavras chave: *Streptococcus pneumoniae*, Real time PCR, diagnóstico laboratorial, meningites bacterianas, métodos de detecção de *S. pneumoniae*.

INTRODUÇÃO

A meningite bacteriana aguda é uma infecção no sistema nervoso central (SNC) causada por vários agentes, sendo os mais comuns *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae b*. Durante muitos anos, o *Haemophilus influenzae b* foi o principal agente causador das meningites, mas sua incidência global foi diminuindo devido à inclusão de vacinas no esquema de imunização, sendo hoje, a *Neisseria meningitidis* e o *Streptococcus pneumoniae* os mais comuns.

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde no ano de 2013 foram registrados 18.602 casos confirmados de meningite bacteriana, sendo o *Streptococcus pneumoniae* responsável por 1057 casos confirmados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Em 2014, o Serviço de Vigilância Epidemiológica do Rio Grande do Sul registrou que no Brasil foram registrados 17.434 casos de meningite confirmados (67%), sendo 5.848 de origem bacteriana, e desses, 947 casos (16%) confirmados por *Streptococcus pneumoniae* (SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE, 2015).

Segundo Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, no ano de 2014 foram registrados 7.814 casos de meningite, sendo 2.244 de origem bacteriana. Os principais agentes confirmados foram a *Neisseria meningitidis* (733 casos com 126 óbitos) e o *Streptococcus pneumoniae* (436 casos e 136 óbitos). Até 11/05/2015 foram registrados 1.234 casos de meningite, sendo 395 de origem bacteriana, sendo os principais agentes confirmados a *Neisseria meningitidis* (129 casos) e *Streptococcus pneumoniae* (74 casos) (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2015).

Os indivíduos mais suscetíveis são crianças menores de 2 anos, imunocomprometidos, idosos, portadores de doenças crônicas, doenças falciformes e após traumatismo craniano (GOLDBLATT; KATHERINE, 2015; GOERING et al., 2014). As vias de infecção são:

- Por contato direto: em neonatos, por defeitos no fechamento do tubo neural e cateteres de derivação liquórica (crianças com hidrocefalia) e em todas as faixas etárias por contaminação durante a punção do LCR através de agulhas e instrumentos mal esterilizados.

- Por via hematogênica: quando o pneumococo sai do sítio de origem (orofaringe, nasofaringe) e cai na corrente sanguínea, atingindo a barreira sangue líquido cefalorraquidiano e atingindo as meninges cranianas (GOLDBLATT; KATHERINE, 2015; GOERING et al., 2014).

Sendo assim, as meningites bacterianas são um problema de saúde pública, devido sua alta taxa de mortalidade, bem como sequelas decorrentes da doença, sendo as meningites pneumocócicas, causadas pelo *Streptococcus pneumoniae*, a segunda maior causa de meningites bacterianas (GOLDBLATT; KATHERINE, 2015).

Esse artigo tem o objetivo mostrar a necessidade de se investir e estudar novos métodos para identificação destes microrganismos de forma mais rápida e precisa (sensibilidade e especificidade), visto que os métodos convencionais (cultura do LCR) levam – se de 1 a 7 dias para se fechar um diagnóstico, e são baseados em análises das características fenotípicas.

1. Morfologia do *Streptococcus pneumoniae*

O *S. pneumoniae* é um coco gram positivo que possui uma membrana celular recoberta por uma cápsula de polissacarídeo, sendo seu principal fator de virulência (Figura 1). As variantes não capsuladas geralmente não causam doenças invasivas.

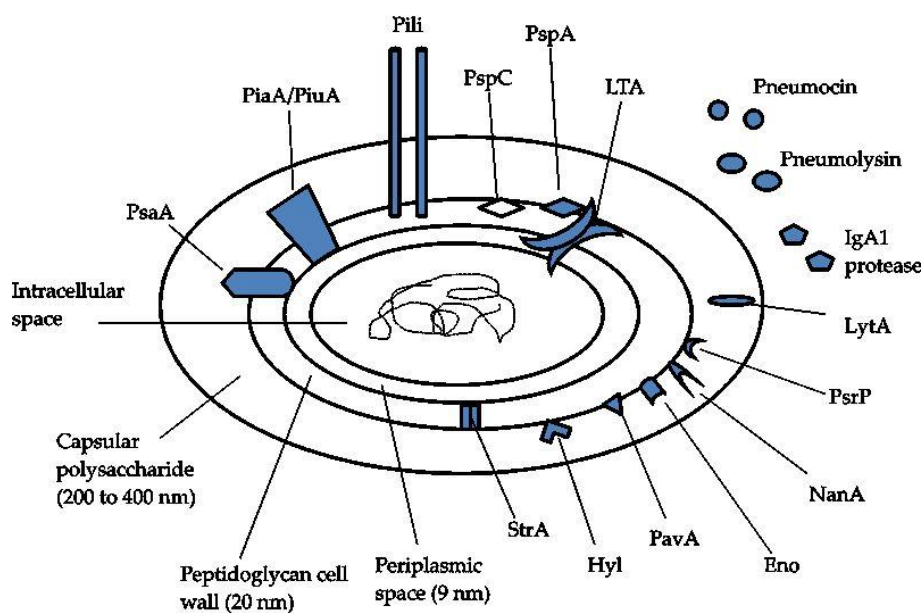


Figura 01 - Morfologia do *Streptococcus pneumoniae*

Fonte – GOERING et al. (2014).

Goering et al. (2014) relatam que o *S. pneumoniae* possui propriedades hemolíticas; seu citoplasma, membrana e parede celular possuem moléculas que desempenham fatores de virulência, como por exemplo:

- 1 - as pneumolisinas: proteína citolítica/citotóxica que interagem com os tecidos do hospedeiro, ativando seu sistema complemento causando danos teciduais e consequentemente, escapam dos mecanismos de defesa do hospedeiro (opsonização e fagocitose) (GOERING et al., 2014).
- 2 - Capsula de polissacarídeo: principal mecanismo de virulência, que impede a ligação das proteínas do sistema complemento, impedindo a atividade fagocítica.
- 3 - Proteína de superfície pneumococcica C: principal molécula de adesão pneumococcica.
- 4 - IgA1 protease: degrada a IgA1 humana.
- 5 - Proteínas que ligam – se ao receptor de ativação plaquetária nas células epiteliais humanas.

Com base nessas estruturas os pneumococos são divididos em sorogrupos e sorotipos e seus antígenos proteicos presentes na parede externa da bactéria. As cepas de *S. pneumoniae* são classificadas em mais de 90 sorotipos capsulares. A partir dessa divisão, foram desenvolvidos ao longo dos últimos anos vários métodos de detecção e

isolamento do *S.pneumoniae*, que variam de métodos convencionais a automatizados, que discutiremos a seguir (GOLDBLATT; KATHERINE, 2015; GOERING et al., 2014).

Em vias gerais, o diagnostico laboratorial começa pela investigação do liquor céfalo raquidiano (LCR) através dos aspectos físicos, químicos e celularidade. No aspecto físico o LCR em condições normais apresenta – se incolor e límpido, semelhante à “água de rocha”. A turvação é o primeiro indicativo de meningite bacteriana.

Nos caracteres químicos a concentração de proteínas deve estar elevada e os níveis de glicose baixos.

Com relação a celularidade, a contagem de leucócitos deve estar elevada, ou seja, acima de 500 leucócitos (polimorfonucleares).

2. Método convencional de identificação no laboratório de microbiologia

Para a investigação do possível patógeno é realizada a coloração de gram, onde são encontrados cocos gram positivos, aos pares (diplococos) intra e extracelulares.

Para a identificação da bactéria é realizado a semeadura do sedimento do LCR em meios de cultura convencionais, tais com Ágar sangue e Ágar chocolate (incubação 35°C em estufa com 5% de CO₂ por 24 horas). Há o crescimento de colônias pequenas, circulares, opacas, cinzas e com alfa hemólise.

Para a classificação devem ser consideradas algumas características metabólicas, como: catalase negativo, bile solubilidade positivo e prova de sensibilidade ao disco de optoquina positivo. Cepas de *S. pneumoniae* resistentes a optoquina (optoquina negativo) e bile solubilidade positivo deve – se encaminhar a cepa para um laboratório de referência. Embora seja o padrão – ouro para o diagnóstico de *S. pneumoniae*, esta técnica ainda sofre muita interferência pelo uso prévio de antimicrobianos em pacientes com suspeita de meningite bacteriana (PAZ et al., 2010).

Um grande auxiliar no diagnostico laboratorial são as provas de pesquisa de antígenos bacterianos diretamente no LCR onde é utilizado kits comerciais por aglutinação em látex (Figura 2). Atualmente são consideradas de grande auxílio na identificação do agente etiológico em casos de meningites bacterianas agudas pois, são de fácil execução, apresenta resultados sensíveis e com rapidez para o diagnóstico, uma vez que o resultado deve ser obtido em poucos minutos após a entrada do LCR no laboratório. A desvantagem deste método e que pode haver resultados falso-positivos devido a reações cruzadas com outros antígenos, mas este método aliado a coloração de gram tem se mostrado de grande utilidade para o diagnostico presuntivo, já que a cultura

convencional pode demorar de 1-7 dias até o resultado final (GOERING et al., 2014; PAZ et al., 2010).

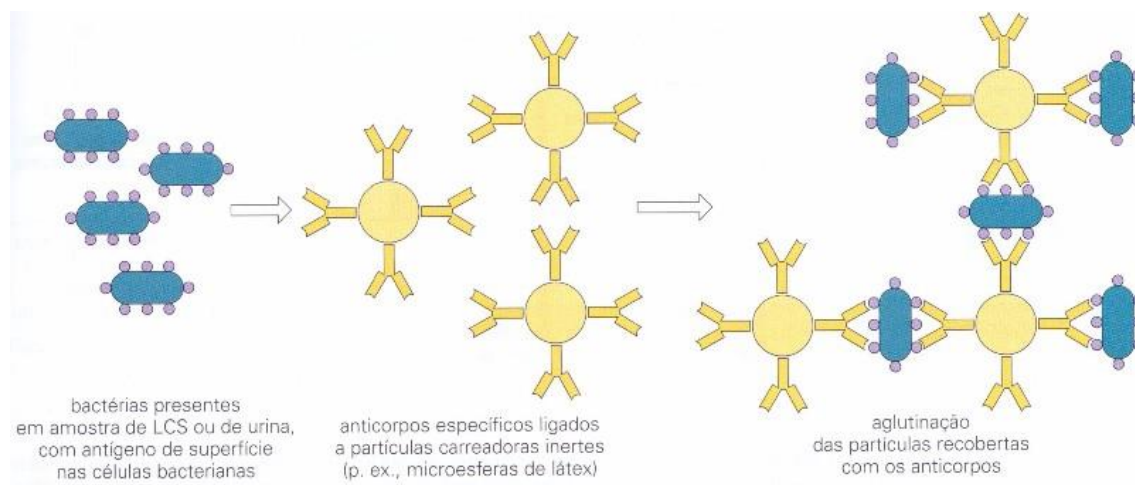


Figura 2 – Reação de látex no diagnóstico laboratorial de meningite.
Fonte – GOERING et al. (2014)

3. Método não convencionais de identificação no laboratório de microbiologia

No Imunoensaio de fase sólida (ELISA), o antígeno do teste é adicionado ao anticorpo aderido a fase sólida e a sua ligação com o anticorpo é medida pela adição de um segundo anticorpo marcado com enzima. Em seguida é realizada a leitura da enzima aderida por meio de uma reação colorimétrica ou fluorimétrica. Em alguns casos, especialmente com antígenos menores, os sítios desocupados podem ser detectados adicionando – se uma quantidade conhecida de antígeno marcado. O anticorpo a ser testado é adicionado ao antígeno imobilizado na fase sólida e detectado pela adição de uma anti-imunoglobulina marcada com enzima. A molécula marcadora pode ser uma sonda fluorescente no lugar de uma enzima (Figura 3). Embora tenha uma boa especificidade, não é de grande utilidade para o diagnóstico laboratorial, somente para diagnóstico complementar, devido ao tempo de execução e por ser um método de alto custo para um laboratório de análises clínicas. Geralmente estes testes são realizados em laboratórios de referência onde o custo diminui devido à grande quantidade de amostras a serem executadas (GOERING et al., 2014).

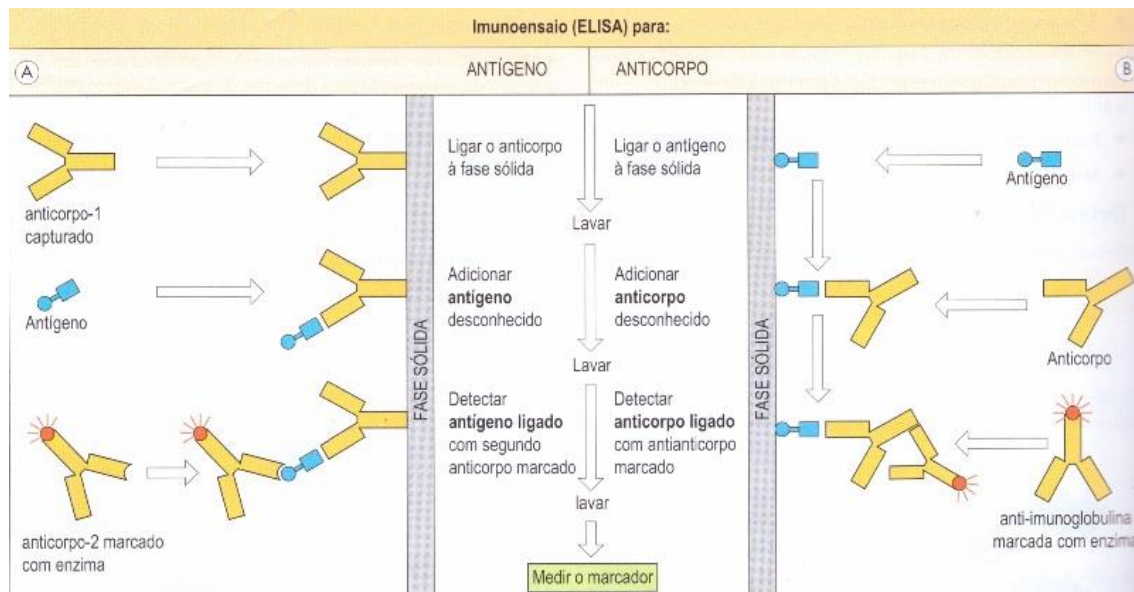


Figura 3 – Visualização do diagnóstico laboratorial por Elisa.
 Fonte – GOERING et al. (2014).

4. Métodos semi automáticos de identificação no laboratório de microbiologia

Este método consiste na detecção da presença ou não de bactérias em uma amostra de sangue (hemocultura) pela presença de CO². A amostra de sangue é inoculada em um recipiente contendo meio de cultura líquido enriquecido, com inibidor de antibióticos (carvão ativado) onde é levada para uma estufa automatizada que faz a leitura da imunofluorescência que altera a base do recipiente de acordo causando a alteração de sua cor. A alteração de cor indica a presença de CO², que é rapidamente detectada e que emite um alerta pelo aparelho. Esses métodos também disponibilizam gráficos para o acompanhamento do crescimento. A detecção pode ser feita de 12-24 horas após a inoculação. A grande vantagem deste método é a rapidez e maior chance de isolamento do patógeno (devido ao inibidor de antibióticos). Sua desvantagem é que a partir da detecção da presença da bactéria na amostra, deve-se seguir com o método convencional de cultura para identificação, o que diminui o tempo de identificação, mas ainda é demorado. O fato de ser possível somente a inoculação de amostras de sangue constitui uma outra desvantagem do método, pois não tem valor para diagnóstico presuntivo e sim somente para complementar a investigação da meningite bacteriana, caso não tenha crescimento nos meios de culturas convencionais e fechamento de diagnóstico. Os métodos mais utilizados são os sistemas BACTEC (BD – Becton X Dickinson Company), e BactAlert (Biomerieux) (BIOMERIEUX, 2015; BD, 2015).

5. Métodos automáticos de identificação no laboratório de microbiologia

Estes métodos consistem na identificação de bactérias através de testes bioquímicos automatizados. É realizada uma inoculação do material biológico direto em um cartão, onde são feitos testes bioquímicos de acordo com cada grupo de bactérias, onde os seus resultados são comparados em um programa de computador com base de dados conhecida para cada tipo bacteriano. O mais utilizado atualmente é o sistema VITEK (Biomerieux), que cobre mais de 300 espécies bacterianas. A grande vantagem frente ao método convencional é que o tempo de identificação é muito mais rápido que a técnica convencional de cultura (BIOMERIEUX, 2015).

Espectrofotometria de massa: método baseado na ionização e desorção a laser assistida por matriz em tempo de voo (MALDI-TOF). Essa identificação é feita por meio de análise dos perfis (fingerprints) de proteína predominante no espectrofotômetro de massa (GOERING et al., 2014; BIOMERIEUX, 2015; PARK et al., 2010).

6. Métodos não convencionais de identificação no laboratório de microbiologia

Consiste na detecção de microrganismos através da detecção de seus genes por meio de sondas de ácido nucléico, com sequências conhecidas. As sondas podem ser marcadas com isótopo radioativo ou, com compostos fluorescentes ou cromogêneas.

PCR (reação em cadeia da polimerase) consiste em fazer cópias de DNA “in vitro” usando os elementos básicos de replicação de DNA, fazendo várias cópias a partir de um único fragmento através de primers específicos, que permite a análise em um único microrganismo da amostra analisada. Os iniciadores se hibridizam com os sítios complementares nas fitas de DNA desnaturadas, onde a enzima DNA polimerase adiciona nucleotídeos complementares permitindo a extensão de cada fita, produzindo mais fitas complementares. Estes iniciadores devem ser exatamente complementares a região que necessita de amplificação e detecção (obtidas através de banco de dados). Os seus produtos são analisados através de eletroforese em gel de agarose, onde há a separação de moléculas de acordo com o seu peso e carga elétrica, comparados com uma amostra padrão (GOERING et al., 2014; LEITE et al., 2014; PRERE; FAYET, 2011).

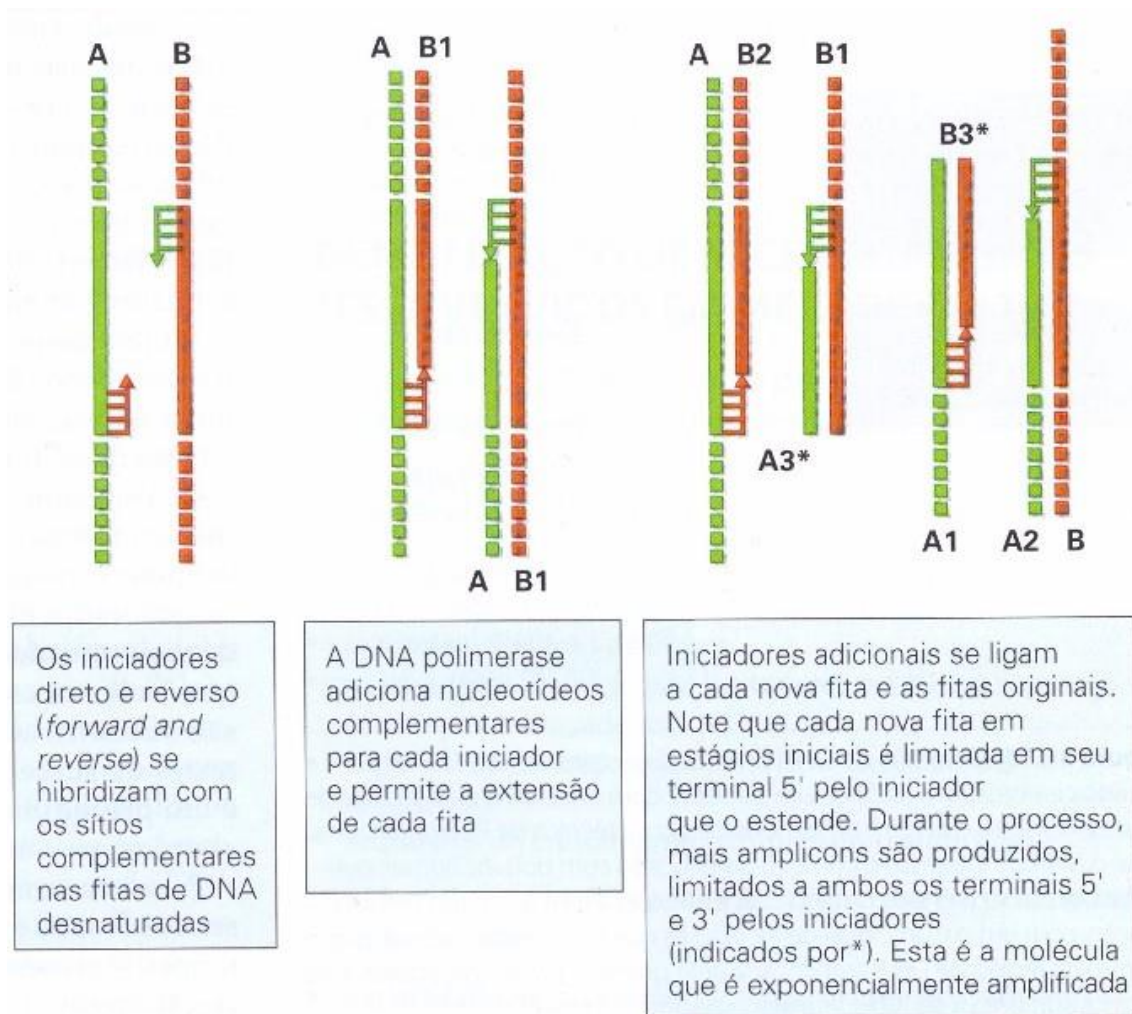


Figura 4 – Visualização de um método não convencional para diagnóstico de meningite. Fonte – LEITE et al. (2014).

A técnica de PCR tem sido substituída pelo PCR em tempo real, que utiliza os mesmos reagentes e técnicas que o método de PCR, mas suas sondas de ácido nucléico específicas são marcadas por fluorescência, permitindo que a reação seja monitorada em tempo real, pois há um acúmulo de fluorescência durante a reação, que é diretamente proporcional ao produto amplificado. “Por não haver a necessidade de análise pós – PCR, os tubos de reação não precisam ser abertos, o que reduz o potencial de contaminação e fornece o resultado em pouco tempo (1 hora)”(GOERING et al., 2014).

Existem atualmente vários estudos comparativos entre métodos de identificação de *S. pneumoniae* por PCR, avaliando principalmente a sua especificidade frente a outros métodos de identificação convencionais, e não convencionais.

Quadro 1: Estudos comparativos entre os diferentes métodos de identificação para *S. pneumoniae*

2011; 6 (6): e20675. doi: 10.1371 / journal.pone.0020675. Epub 22 de junho de 2011.	Incorporação de PCR em tempo real em vigilância em saúde pública de rotina da cultura meningite bacteriana negativa em São Paulo, Brasil.	LCR Sangue (soro)
. InfectDis BMC 2013 22 de janeiro, 13: 26. doi: 10,1186 / 1471-2334-13-26.	Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis and Haemophilus influenzae meningitis diagnosis.	LCR
PLoS One. 2012; 7(8):e42954. doi: 10.1371/journal.pone.0042954. Epub 2012 Aug 10	The enhanced pneumococcal LAMP assay: a clinical tool for the diagnosis of meningitis due to Streptococcus pneumoniae.	LCR

No primeiro estudo foram realizados ensaios laboratoriais em amostras de LCR com cultura negativas e positivas através do método de PCR em tempo real, com pesquisa do gene de autolisina pneumococcica LyTA. A especificidade do método foi analisada em amostras de LCR foi de 97.8%, já em amostras de soro os resultados não foram satisfatórias devido a moléculas interferentes nesse tipo de amostra. O estudo concluiu que a técnica é altamente sensível e específica, principalmente em amostras onde o paciente estava em uso de antimicrobianos. Também demonstrou a importância desta técnica ser introduzida em centros de referência como rotina para comparação com a cultura e outros testes sorológicos, e assim, dando mais precisão para a base de dados de vigilância epidemiológica (PARK et al., 2010).

No segundo estudo também foram feitos ensaios laboratoriais em amostras de LCR, utilizando método de PCR em tempo real com o alvo sendo o gene LyTA, sendo que alguns destes pacientes já estavam em terapia antimicrobiana. Houve uma comparação entre a especificidade e sensibilidade do método, frente a resultados em

amostras com coloração de gram com suspeita de *S.pneumoniae*, sendo este microrganismo detectado em cerca de 90% das amostras. Concluiu – se que tanto a coloração de gram, como o PCR em tempo real são altamente precisos para uma detecção rápida de *S. penumoniae* neste tipo de amostra, bem como são menos afetados pelo uso de agentes antimicrobianos (SACHI et al., 2013).

No terceiro estudo foi utilizada a técnica de LAMP, que utiliza a detecção de um ácido nucléico mediada por um ciclo de amplificação isotérmica, para a detecção do gene LyTA em amostras de LCR. O estudo visa a melhoria da especificidade na detecção deste antígeno, pois de acordo com o mesmo, há cepas de *Streptococcus mitis* que também possuem o gene LyTA, resultando assim em excessos de detecção de pneumococo quando utilizada técnicas de PCR. Concluiu – se que houve uma sensibilidade clínica e analítica maior na técnica de LAMP (100%) do que em técnicas por PCR (54,5%) e cultura convencional (33,3%) (SACHI et al., 2013).

CONCLUSÃO

O presente estudo concluiu que o método convencional de cultura ainda é o padrão – ouro para o diagnóstico laboratorial do *S. pneumoniae* em amostras de LCR. Mas estudos revelam que este método ainda tem muitas falhas, pois dependem dos fatores pré analíticos, como coleta e transporte adequados da amostra, e também da inibição do crescimento devido ao uso prévio de antibióticos pelo paciente, bem como estes métodos são baseados nas características fenotípicas da bactéria. O método de gram apresenta – se como o melhor e mais acessível método para o diagnóstico presuntivo. Embora haja um crescimento na utilização dos testes rápidos de aglutinação em látex diretamente da amostra clínica, ele ainda não é utilizado em todos os laboratórios, devido ao custo alto dos kits de identificação, não sendo viáveis, dependendo da quantidade de amostras clínicas recebidas pelo laboratório.

As técnicas de identificação por ELISA e métodos automatizados por identificação através de provas bioquímicas também não são muito utilizados, devido ao alto custo na aquisição de equipamento e reagentes, não sendo viáveis para este tipo de detecção.

As técnicas que utilizam a espectrofotometria de massa (MALDI TOF) são consideradas as maiores promessas neste segmento. Embora estas técnicas estão sendo

utilizadas para fins de diagnóstico, ainda existem poucos estudos para sua utilização, bem como a comparação desta técnica frente a métodos convencionais.

As técnicas de biologia molecular, como o PCR em tempo real vem despontando como uma ótima ferramenta para o diagnóstico rápido e preciso, principalmente em amostras de LCR, por não sofrer interferência dos fatores pré-analíticos, uso de antibióticos, e permitir que sejam feitas análises em amostras clínicas com carga bacteriana muito baixa, com alta especificidade e sensibilidade, bem como utiliza a detecção através de técnicas baseado no gene da bactéria. Por esse motivo, vem sendo utilizadas em vários estudos epidemiológicos, aumentando a especificidade destes dados e melhorando as ações em saúde pública.

O maior desafio será trazer estas técnicas de biologia molecular, como por exemplo o PCR em tempo real para os laboratórios de análise clínicas para utilização na rotina para o diagnóstico, pois os resultados podem demorar de 1-3 horas, dependendo da técnica, sendo uma ótima ferramenta para o diagnóstico rápido e preciso em casos de meningite bacteriana, frente a 1-7 dias dos métodos convencionais.

Portanto, direcionando para os laboratórios de análises clínicas, enquanto não há a viabilidade da introdução destas novas técnicas, os métodos como a coloração de grame testes de aglutinação em látex ainda são as melhores opções para um diagnóstico presuntivo, bem como o padrão ouro ainda sendo os métodos convencionais de cultura e identificação para *S. pneumoniae*.

REFERÊNCIAS

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: www.saude.gov.br/svs. Acesso em: 10/08/2015.

SÃO PAULO. Secretaria Estadual da Saúde. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/>. Acesso em: 02/07/2015.

Centro de Vigilância Epidemiológica “Alexandre Vranjac” (CVE). Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/>. Acesso em: 10/08/2015.

GOLDBLATT, D; KATHERINE L. O'BRIEN. "Infecções Pneumocócicas." *Doenças Infeciosas de Harrison*, 2015.

GOERING, R. V. et al. **Mims microbiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.6--<http://www.intechopen.com/>.

PAZ, C., et al. Livro Procedimentos básicos em Microbiologia clínica. 3 Ed Sarvier 2010.

BIOMERIEUX. Disponível em: <http://www.biomerieux.com.br/>. Acesso em: 01/09/2015.

BD. Disponível em: <http://www.bd.com/brasil/>. Acesso em: 01/09/2015.

LEITE, L. C. P.; LEITE, M. T. C.; BORGES, W. S. "Comparação entre técnica manual e sistema automatizado para análise de culturas de líquido cefalorraquidiano em Suspeitas de meningites." **Saúde**, 2014.

PRERE, M. F.; FAYER, O. A. A specific polymerase chain reaction test for the identification of Streptococcus pneumonia. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2011.

PARK, H. K.; LEE, H. J.; KIM, W. Real-time PCR assays for the detection and quantification of Streptococcus pneumoniae. **FEMS Microbiol Lett**. 2010.

SACCHI, C. T.; FUKASA, W. A. L. O.; GONÇALVES MG, SALGADO MM, SHUTT KA, CARVALHANAS TR, RIBEIRO AF, KEMP B, GORLA MC, ALBERNAZ RK, MARQUES EG, CRUCIANO A, WALDMAN

EA, BRANDILEONE MC, HARRISON LH Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. São Paulo RT-PCR Surveillance Project Team. **BMC Infect Dis.** 2013 Jan 22;13:26. doi: 10.1186/1471-2334-13-26.

KIM, D. W.; KILGORE, P. E.; KIM, E. J.; KIM, S. A.; ANH, D. D.; et al. (2012) The Enhanced Pneumococcal LAMP Assay: A Clinical Tool for the Diagnosis of Meningitis Due to *Streptococcus pneumoniae*. PLoS ONE 7(8): e42954. doi: 10.1371/journal.pone.0042954