

Avaliação dos exames laboratoriais para o diagnóstico das meningites infecciosas no estado de Sergipe, durante o período de 1997 a 2003

Assessment of the laboratorial examinations for diagnosing infectious meningitis performed in the Sergipe state, during the period from 1997 to 2003

RIALA6/1093

Antonio M. BARBOSA JUNIOR^{* 2,3}, Dângelly L. F. M. de MÉLO³, Patrícia O. SANTOS³, Maria de Fátima TRAVÁLIA¹, Rita de C. TRINDADE³.

^{*}Endereço para correspondência: Av. Marechal Rondon, s/n Jardim Rosa Elze. CCBS/DMO, 145, sala 15. São Cristóvão, Sergipe. CEP: 49100-000. Telefone: 79 3212 6628. E-mail para contato: amjunior@ufs.br

¹Laboratório de Micologia, Instituto Parreiras Hortas, LACEN/SE.

²Bolsista de Iniciação Científica Pibic/CNPq.

³LMA, Laboratório de Microbiologia Aplicada, UFS, Universidade Federal de Sergipe.

Recebido: 07/11/2005 – Aceito para publicação: 15/12/2006

RESUMO

As meningites infecciosas continuam a ocorrer no país com alta incidência e elevados índices de mortalidade, apesar da existência de programas de prevenção da doença e dos avanços na tecnologia empregada na detecção dos microrganismos envolvidos. O exame laboratorial do líquido céfalo-raquidiano (LCR) é a base para efetuar o diagnóstico e para introdução de tratamento eficaz ao paciente. Na rotina laboratorial, são utilizados para o diagnóstico: exame microscópico, cultura e pesquisa de antígeno. Visando conhecer a eficiência e a capacidade de resposta, bem como para efetuar a correlação das referidas técnicas laboratoriais com os dados clínicos, este trabalho investigou 510 fichas de registros de pacientes com suspeita de meningite, atendidos pelo Serviço Único de Saúde, que deram entrada no período de 1997 a 2003, no Laboratório Central de Saúde Pública no estado de Sergipe, no Instituto Parreiras Horta. Foi realizada a análise de frequências absolutas dos testes utilizados no diagnóstico das meningites infecciosas. Os dados mostram uma diminuição, nos últimos anos, da porcentagem de confirmação de diagnóstico de meningite por meio de cultura, fato que pode ser observado em pesquisas realizadas em outros laboratórios do Brasil. Em contrapartida, verifica-se um aumento expressivo no número de paciente com meningites confirmado por meio de bacterioscopia, utilizando-se a coloração de Gram. Os resultados apresentados confirmam a importância do diagnóstico rápido e preciso que ofereça vantagens clínicas significativas para o emprego da terapia antimicrobiana adequada e acompanhamento da evolução da doença.

Palavras-chave. diagnóstico microbiológico, meningite infecciosa, Sergipe.

ABSTRACT

High incidences of infectious meningitis with high mortality index remains occurring in Brazil, despite of the prevention programs and significant advances in the microorganism identification technologies. The laboratorial examination of the cerebrospinal fluid (CSF) is fundamental for accomplishing an accurate diagnosis and for introducing adequate treatment. Microscopic examination, culture, and antigen detection have been used in laboratory routine. This study aimed to assess the techniques used in Sergipe in the period from 1997 to 2003 for infectious meningitis diagnosis. The 510 record sheets of patients with suspicion of meningitis, who had given entrance during that period in the Central Laboratory of Health Public - Instituto Parreiras Horta in the State of Sergipe, were analyzed. Analyzes on absolute frequencies of the tests used for infectious meningitis diagnosis was carried out. In the last years, a reduction in frequency of cases confirmed by culture has perceived. This fact has also been noticed in other Brazilian laboratories. On the other hand, a substantial increase in the number of cases confirmed

by bacterioscopy (Gram stain) has been observed. Efficient meningitis diagnosis provides significant clinical benefits for monitoring patients, introducing the antimicrobial therapy, and for disease evolution following-up.

Key words. Microbial diagnosis, infectious meningitis, laboratorial diagnosis.

INTRODUÇÃO

As meningites infecciosas continuam ocorrendo em nosso meio com alta incidência e elevados índices de mortalidade, apesar de existirem programas de prevenção da doença e das técnicas avançadas de detecção dos microrganismos. A utilização do líquido cefalorraquidiano (LCR), dentre os vários materiais biológicos, tem se mostrado mais adequado para a realização de exames laboratoriais por favorecer diagnóstico preciso e confiável. O Ministério da Saúde¹ preconiza que para o diagnóstico das meningites sejam realizados, na rotina laboratorial, o exame microscópico, a cultura microbiana e a pesquisa de antígeno no LCR.

O exame microscópico do LCR (bacterioscopia ou exame direto) é valorizado por possibilitar a visualização rápida do agente etiológico, que é importante para a identificação presuntiva do microrganismo e para a confirmação do diagnóstico clínico¹. O conhecimento precoce do agente é importante para a correta administração do antimicrobiano, como também, para fazer o diagnóstico diferencial entre meningite bacteriana e fúngica, crucial para o prognóstico. Erros na interpretação dos resultados na microscopia podem ocorrer, principalmente, se os microrganismos sofrerem alterações físico-químicas, decorrentes da administração prévia de antibióticos, capazes de alterar a estrutura da parede celular bacteriana e falsear os resultados da coloração de Gram². Além disso, falhas operacionais podem possibilitar o desenvolvimento de bactérias contaminantes, oriundas, por exemplo, da pele do paciente, das mãos do operador ou mesmo dos tubos de coleta¹.

Em relação ao cultivo de microrganismos, método considerado padrão ouro é importante se ter cuidado com o transporte e conservação do LCR, assim como na escolha dos meios de cultura, principalmente, porque os microrganismos causadores das meningites infecciosas são bastante sensíveis a alterações de umidade, calor e temperatura³. O Ministério da Saúde¹ salienta a importância do registro, na ficha do paciente, do volume de LCR semeado e se o mesmo fazia ou não uso de antimicrobianos antes da punção, fato que pode inibir o desenvolvimento microbiano *in vitro*¹. É possível que a importância do volume esteja ligada à sensibilidade do teste, ou seja, às probabilidades de crescimento microbiano.

Recomendam-se os exames imunobiológicos (Latex e Contra-imunoeletroforese – CIE) como complemento ao diagnóstico das meningites infecciosas, na pesquisa de antígenos presentes no LCR¹; a qualidade deste exame depende da qualidade

dos reagentes e dos anti-soros empregados na reação imunológica, principalmente para a detecção de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*.

Relatos de resultados falso-positivos devido a reações cruzadas entre gêneros e espécies bacterianas^{4,5} justificam a importância do cuidado com a qualidade dos reagentes, bem como da correta interpretação dos resultados, durante a realização de técnicas imunológicas.

Após consultar todos os parâmetros recomendados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico das meningites infecciosas, o presente trabalho visou realizar um levantamento sobre a utilização das técnicas preconizadas para o diagnóstico das meningites infecciosas no Estado de Sergipe, no período de outubro de 1997 a junho de 2003, e correlacionar com o diagnóstico clínico obtido.

MATERIAL E MÉTODO

No período de outubro de 1997 a junho de 2003, foram analisadas 516 fichas de pacientes com suspeita de meningite, atendidos pelo Serviço Único de Saúde (SUS) que deram entrada no Laboratório Central de Saúde Pública no Estado de Sergipe localizado no Instituto Parreiras Horta (LACEN/SE-IPH). A investigação foi realizada buscando levantar os dados acerca da realização e dos resultados disponibilizados pelos exames recomendados pelo Centro de Referência Nacional para Meningite no Instituto Adolfo Lutz – Ministério da Saúde¹, a saber: imunobiológico, microscopia e cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No diagnóstico das meningites infecciosas tornam-se importantes, os procedimentos de coleta, transporte, e o processamento adequado da amostra de LCR, uma vez que este é um sítio caracteristicamente estéril, cuja colonização por qualquer microrganismo significa infecção grave. Portanto, punção lombar feita de modo asséptico seguido de rápido transporte dessa amostra clínica, agilidade no processamento da microscopia direta (coloração de Gram e Tinta da China) e cultivo microbiano, contribuem para um preciso diagnóstico e identificação correta do agente etiológico. Esses dados fornecem informações que podem ser utilizadas em estudos epidemiológicos das meningites infecciosas.

O diagnóstico baseado na bacterioscopia, ou exame direto depende do número de bactérias por mL de LCR não centrifugado, uma vez que a bacterioscopia só é sensível a partir de 10^5 bactérias/mL⁵. Dados da literatura revelam que, nesse método, o índice de erros de leitura é elevado², e que quando comparados com os resultados obtidos pelo cultivo do microrganismo chega a representar 15%⁶.

Quando há necessidade de um processamento diferenciado do material biológico (como a técnica utilizada para o cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*), além dos critérios acima citados torna-se fundamental a proximidade entre o local da coleta e o laboratório de processamento, pois, por se tratar de um microrganismo altamente contagioso, de desenvolvimento lento cujo cultivo só é realizado nos laboratórios de referência em micobactérias, quanto mais imediata for a sementeira, menor a exposição do corpo técnico, e menores os riscos de contaminação e perda de viabilidade do microrganismo. Além disso, de maneira geral, quanto menor o tempo e a distância entre a punção e a sementeira do líquido nos meios de cultura, maior o índice de detecção exata do microrganismo causador. Por isso, atualmente, os laboratórios de meningites estão sendo montados anexos ao Hospital Central de cada município que atendem todos ou quase todos os pacientes com suspeita clínica de meningite.

Vale destacar também a importância da qualificação e capacitação da equipe técnica e da padronização dos protocolos para garantir a detecção rápida presuntiva e diferencial do

agente etiológico pelas técnicas de coloração, já que o cultivo desses agentes leva de 24 a 72 horas (exceção do *Mycobacterium tuberculosis* que necessita de aproximadamente 45 dias para o seu crescimento). Outro ponto crítico é a ocorrência generalizada de terapia antibacteriana ou antifúngica instituída nos pacientes antes da realização da punção o que dificulta e até inviabiliza o cultivo microbiano comprometendo, conseqüentemente, a precisão e acuidade do diagnóstico definitivo como preconiza o Ministério da Saúde.

Devido a esses fatores citados, o levantamento realizado sobre os resultados disponibilizados pelo LACEN-SE entre 1999 e 2003, referentes ao diagnóstico dos agentes etiológicos causadores da meningite infecciosa, apresentaram diferenças nos três métodos investigados: cultura, exame direto e imunobiológico.

A Tabela 1 apresenta os dados obtidos. Pode-se observar que dos 510 casos clínicos registrados no LACEN-SE com suspeita clínica de meningite, todos foram confirmados pelo exame direto (100%), 467 por cultura, o que representa 91,5% e 496 pelo exame imunobiológico (97,2%). Os dados revelam que, no período, houve um aumento de 10% na confirmação de casos pela bacterioscopia, utilizando-se a coloração de Gram, e que todos os casos confirmados pelo exame direto foram, em última análise, confirmados pela cultura ou pelo teste imunobiológico. Foi registrado também, no período, uma queda (de 118 em 1997 a 16 em 2003) na confirmação do diagnóstico por cultura.

Tabela 1. Frequência de agentes etiológicos diagnosticados pelo exame direto, cultura e exame imunobiológico em pacientes com meningite infecciosa, no Estado de Sergipe, no período de outubro de 1997 a junho de 2003, no LACEN/SE – IPH.

Agente Etiológico	Sorogrupos/ Sorotipo	1997			1998			1999			2000			2001			2002			2003		
		ED	C	IB	ED	C	IB	ED	C	IB	ED	C	IB	ED	C	IB	ED	C	IB	ED	C	IB
<i>N. meningitidis</i>	–	52	66		22	39		30	40	32	31	26	31	21	16	21	14	11	17	2	2	4
	A			1			1			2			z			z			z			z
	B			40			26			29			28			21			14			4
	C			4			1			1			3			0			3			0
<i>S. pneumoniae</i>	–	14	10	13	28	14	25	38	22	31	36	18	26	16	10	1	14	7	14	3	4	7
<i>H. influenzae</i>	B	46	33	26	28	19	21	42	42	28	18	14	11	4	2	1	2	z	2	z	z	z
BGN não fermentador	–	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	1	z	z	4	z
<i>S. aureus</i>	–	z	2	z	z	2	z	1	2	z	z	1	z	2	z	z	z	4	z	z	z	z
Enterobactérias	–	z	z	z	z	1	z	2	6	2	1	3	z	6	12	z	z	3	z	3	4	z
<i>M. tuberculosis</i>	–	z	z	z	1	1	1	z	z	z	1	1	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
<i>C. neoformans</i>	–	3	3	3	z	1	z	3	1	z	2	1	z	6	6	z	7	2	z	2	1	z
<i>Candida</i> sp.	–	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	1	z	z	z	z
Outros agentes etiológicos	–	z	4	z	1	1	z	z	z	z	8	1	1	z	3	z	z	z	z	z	z	z
Total		115	118	87	80	78	75	116	113	125	97	65	100	55	49	44	37	29	50	10	15	15

ED: exame direto; C: cultura; IB: exame imunobiológico; BGN: bacilo gram negativo; z: dados ausentes

Este fato que pode ser observado em pesquisas realizadas em outros laboratórios do Brasil¹. É possível que esses resultados estejam relacionados com a melhora da qualidade do serviço, no que diz respeito a otimização da comunicação entre o atendimento, ambulatorial ou de urgência e o laboratório, diminuindo os casos de administração de antimicrobianos previamente a punção, melhor assepsia durante a punção lombar e a implantação de cuidados como sementeira imediata, qualidade dos meios de cultura dentre outros, fruto da qualificação do corpo técnico do Laboratório Central de Saúde Pública de Sergipe realizado em 1999. Outro fato com o qual se pode relacionar a melhor disponibilização dos dados a partir de 1999 é a implantação da ficha de exame do LCR. Os dados foram, desde então, organizados e padronizados, o que nos permite tabulá-los e compará-los. A melhor performance do exame direto, obtida nesse levantamento, no entanto, discorda da literatura, que não só o cita como menos sensível como revela que o índice de erros de leitura é elevado, devendo-se esperar melhores resultados da cultura^{2,6}.

É possível ainda que a menor sensibilidade da cultura esteja atrelada à administração de antimicrobianos antes da punção líquórica do paciente, pois apesar da melhor comunicação entre os diferentes serviços, isto ainda acontece em função da precariedade de algumas unidades básicas de saúde instaladas em cidades pequenas, longe dos laboratórios de referência ou sem disponibilidade de neurocirurgias de plantão para realizar a punção líquórica. No caso específico dos portadores do vírus HIV, os antimicrobianos estão inseridos nos coquetéis administrados quando o número de linfócitos TCD4 atinge níveis muito baixos, independente da presença de sintomas. Tal conduta clínica pode levar à baixa positividade da cultura (padrão ouro) por inviabilizar o crescimento microbiano^{7,8}.

Pode-se verificar também que de 2001 a 2003 não houve confirmação de casos de meningite por *H. influenzae* em Sergipe, o que pode ser atribuído à vacinação em massa realizada em 1999. Paralelamente, ocorreu um aumento na detecção de outros agentes etiológicos, principalmente *S. aureus* e *C. neoformans*. Das 467 culturas positivas do período, 200 (43,2%) foram identificadas como *N. meningitidis*, 110 (21%) como *H. influenzae*, 85 (18%), *S. pneumoniae*, 29 (6,2%) Enterobactérias e 14 (3,2%) *C. neoformans*. Somente dois casos de meningite tuberculosa foram registrados, sendo confirmado pela cultura do bacilo álcool ácido resistente.

Tais resultados apresentam-se em concordância com dados mundiais em relação à prevalência de *N. meningitidis* (43,2%). Isolados de *N. meningitidis* dos sorogrupos A, B e C, são responsáveis por mais de 90% dos casos de meningites bacterianas associados a surtos, endemias e epidemias⁷. O sorogrupo A predomina na África, sendo responsável por ondas epidêmicas, enquanto B e C prevalecem em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, estando assim, associados, principalmente, a surtos esporádicos e epidemias⁸. Alguns autores relatam a predominância do sorogrupo A^{9,10}.

Outro aspecto relevante foi a prevalência de Bacilos Gram Negativos (BGN). Apesar do bom nível de detecção apresentado pelo serviço do Laboratório Central de Sergipe, esse dado reforça a necessidade de melhora na qualidade e rapidez das informações, cruciais para a qualidade do diagnóstico clínico e laboratorial, principalmente, para doenças de notificação compulsória.

A Tabela 1 apresenta também os resultados dos exames realizados através de testes imunológicos. Das 510 fichas analisadas no período, 496 informaram os dados da pesquisa de sorogrupos e sorotipos. Foi observada a prevalência do sorogrupo B de *N. meningitidis* e sorotipo B de *H. influenzae*, nesse caso o único sorotipo registrado. Nos últimos anos tais pesquisas continuam sendo realizadas nos casos onde há suspeita de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*. Para *C. neoformans* deixou-se de realizar devido ao alto custo dos reagentes. Mesmo assim, o LACEN-SE rotineiramente faz apenas o teste do Látex para *N. meningitidis*. Os demais são encaminhados para o Laboratório Central de Referência em meningites de Recife, PE.

Vale ressaltar a importância da aliança entre a capacitação e a atualização dos profissionais envolvidos (tanto do ponto de vista clínico como laboratorial), na busca constante da melhora na acuidade e rapidez dos exames microbiológicos. Nesse particular, as técnicas que utilizam a biologia molecular disponibilizam mais rápida e especificamente os dados utilizados para o diagnóstico, como também informações epidemiológicas fundamentais sobre os agentes etiológicos que causam a meningite infecciosa, o que em última análise leva ao conhecimento da dinâmica da doença.

Dentre as técnicas moleculares disponíveis, as mais difundidas são as que fazem uso da amplificação dos genes alvo através da reação em cadeia da DNA polimerase – PCR. Desenvolvida em 1987 por Mullins e Faloona¹¹ a PCR vem sendo otimizada por vários pesquisadores de modo que atualmente tem-se uma variedade e propostas que vão desde reações *multiplex* com capacidade de amplificar, em uma única reação genes-alvo presentes nos principais agentes da meningite bacteriana^{12,13,14}, até as reações que podem ser acompanhadas através de gráficos que disponibilizam, em tempo real a amplificação dos genes alvo sem a necessidade da eletroforese, em equipamentos e técnicas conhecidas como *real time PCR*^{15,16}. No entanto, apesar dos resultados promissores no campo da pesquisa, e da realidade de outros países, ainda não se tem uma técnica molecular padronizada no Brasil para ser utilizada como rotina laboratorial pelo programa nacional de controle das meningites.

Neste sentido, reitera-se a importância da padronização das técnicas, treinamento do pessoal e centralização do controle, assim como se acredita na validade do investimento na implantação de técnicas moleculares como complementação ao diagnóstico tradicional.

Finalizando, um diagnóstico preciso oferece vantagens clínicas significativas para o direcionamento da terapia

antimicrobiana e para a evolução da doença, como também pode ser o primeiro passo na elucidação da sua dinâmica em determinada região, informação esta que, por sua vez, pode ser utilizada como base para as discussões que envolvem propostas de programas de controle.

CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que o serviço realizado no LACEN-SE apresentou resultados compatíveis com aqueles disponibilizados pelos demais laboratórios de referência do país e que, no período e localidade investigados o exame direto por bacterioscopia foi o recurso laboratorial que apresentou maior correspondência com o diagnóstico clínico (100%/510), seguido de perto pelo exame imunológico (97,2%/496) e pela cultura (91,5%/467), padrão-ouro do diagnóstico laboratorial. Pode-se assim concluir ressaltando a importância da associação de métodos, do controle no transporte e recebimento do material clínico e do processamento imediato, bem como da necessidade de se buscar aumentar a acurácia da cultura e a padronização de técnicas mais precisas e rápidas como as moleculares, para assim, melhorar a precisão e a rapidez do diagnóstico das meningites infecciosas, disponibilizando assim, informações seguras para as investigações epidemiológicas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Aos funcionários dos Laboratórios de Bacteriologia e de Micologia do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Sergipe.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica: meningites. Brasília/DF, 2002. 579-632.
2. Hyslop NE, Swartz MN. Bacterial meningitis. *Postgrad Med* 1975; 58(3):120-8, 1975.
3. Lennette EH, Ballows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology. American Microbiology Society, 4th edition, Washington DC, 1985. 1149p.
4. Geiseler PJ, Nelson KE, Levin S, Reddi KT, Moses VK. Community acquired purulent meningitis: a review of 1.316 cases during the antibiotic era, 1954-1976. *Rev Infect Dis* 1980; 2(5): 725-44.
5. 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.
6. Jones RG. Bacterial meningitis. Part I Incidence and diagnosis. *S Afr Med J*. 1967; 41: 75-9.
7. Peltola H. Meningococcal disease: still with us. *Rev Inst Dis* 1994; 5: 71-91.
8. Virgi M. Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis trends. *Microbiol* 1983; 4: 466-70.
9. Kumar P, Verma IC. Antibiotic therapy for bacterial meningitis in children in developing countries. *Bul of the WHO* 1993; 71: 183-8.
10. Stocco JM, Porfírio FMV, Carvalho VO, Nunes FF, Santos NNQ. Campos CEOP, Schimal MR, Kuschneroff TM. Septicemia com púrpura por *Haemophilus influenzae* e sua semelhança com meningococcemia. In: XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Natal. p. 196, 1990.
11. Mullis KB, Faloona FA, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase – catalysed. *Meth Enzymol* 1987; 155: 335-50.
12. Baethgen LF, Morales C, Weidlich L, Rios S, Knetzsch CI, Silva MS, Rossetti MLR, Zaha A. Direct-test PCR for detection of meningococcal DNA and its serogroup characterization: standardization and adaptation for use in a public health laboratory. *J Med Microbiol* 2003; 52: 793-9.
13. Bryant PA, Li HY, Zaia A, Griffith J, Hoog G, Curtis N, Carrapetis 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): 2219-26.
14. Pinner RW, Hassen RA, Powderly WG. Prospects for preventing cryptococcosis in person infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1995; 21:103-7.
15. Powderly WG. Recent advances in management of cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1996; 22(2): 119-23.
16. Kaczmarek EB, Fox AJ, Edwards-Jones V, Borrow R, Guiver, M, Corless, CE. 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.