UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *Neisseria meningitidis* EM
AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO
EMPREGANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE-
MULTIPLEX

JANE HARUMI ATOBE

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. ELSA MASAE MAMIZUKA

São Paulo
1998

JANE HARUMI ATOBE

AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *Neisseria meningitidis* EM
AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO
EMPREGANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

COMISSÃO JULGADORA
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
Presidente

Prof. Dr. Manoel R. Schmal
1º Examinador

Profa. Dra. Kioko Takei
2º Examinador

São Paulo, 30 de setembro de 1998.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

A881a Atobe, Jane Harumi
Amplificação de DNA de *Neisseria meningitidis* em amostras de líquido cefalorraquidiano empregando a reação em cadeia da polimerase-multiplex / Jane Harumi Atobe. -- São Paulo, 1998. 97p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Mamizuka, Elsa Masae

1. Microbiologia médica 2. Genética : Bactérias I. T. II. Mamizuka, Elsa Masae, orientador.

616.01 CDD

Aos meus pais

Kenji Atobe e Shissako N. Atobe

cujo exemplo de dedicação e compreensão

foram a base de minha formação.

Aos meus irmãos,

Kazumi, Yukio e Suemi

pelo constante apoio, incentivo e colaboração.

À
Prof^a. Dr^a. Elsa M. Mamizuka
minha sincera gratidão e
reconhecimento pela orientação,
dedicação e competência
profissional.

*“A procura da verdade é difícil e é fácil, já
que ninguém poderá desvendá-la por
completo ou ignorá-la inteiramente.
Contudo, cada um de nós poderá
acrescentar um pouco do nosso
conhecimento sobre a natureza e, disto,
uma certa grandeza emergirá.”*

Aristóteles

AGRADECIMENTOS:

Ao Coordenador do curso de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, Prof. Assoc. Mário H. Hirata pela participação e apoio técnico para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Titular Sumie H. Shimizu pela inestimável colaboração nas correções deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Manoel R. Schmal do Instituto de Infectologia Emílio Ribas - SP pela colaboração e valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. S. Moisés Hernández A. pelo incentivo, colaboração, participação e contribuição científica.

À Prof^a. Dr^a. Rosário D. C. Hirata do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - FCF - USP pela colaboração e apoio técnico.

À Prof^a. Dr^a.M^a. de Fátima B. Pavan pela revisão e valiosas sugestões.

À Banca examinadora da Qualificação da dissertação Prof. Dr. Manoel R. Schmal, Prof. Dr. Edson Durigon, Dr. Carmo E. M. Andrade, Prof^a. Dr^a. Tuba M. Kuschnaroff e Prof^a. Dr^a. Adelaide J. Vaz por acrescentar experiências e enriquecer o trabalho.

Aos pesquisadores do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo Cláudio T. Sacchi por ceder gentilmente as cepas-padrão e Silvana T. Casagrande pela assistência técnica na etapa inicial do experimento.

Aos amigos do Laboratório de Referência Nacional de Fagotipagem de *S. aureus* do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - FCF - USP:

Geraldo A. Oliveira, Regina Iêda L. Ribeiro, Nilton Lincopan, Cláudia F. Rosso pela valiosa amizade, espírito de colaboração e intercâmbio de conhecimentos.

Às colegas do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - FCF - USP: Prof^a. Dr^a. Marina B. Martinez, Ermelinda, Doroti, Agda, Adriana, Carla e Juliana pela convivência durante a realização deste trabalho.

Às colegas do Instituto de Infectologia Emílio Ribas - São Paulo: Isabel E. Kawamura, Wilma A. Fernandes, Regina C. Pascoal, F. Takako Yamada pela colaboração na obtenção das amostras e incentivo.

À Dr^a. Luiza Helena Faleiros da Diretoria Científica do instituto de Infectologia Emílio Ribas - São Paulo por permitir a realização deste trabalho.

Ao Dr. Aluizio B. B. Machado e Dr^a. Isabel Vaz do Hospital das Clínicas - São Paulo pelas amostras cedidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro.

À bibliotecária Moema R. dos Santos pela revisão bibliográfica.

À todos, que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Neisseria meningitidis</i> - ASPECTOS GERAIS	1
1.1.1. Identificação Bioquímica	2
1.1.2. Classificação	2
1.1.3. Patogenia	4
1.2. MENINGITE BACTERIANA	5
1.2.1. Epidemiologia	6
1.2.2. Aspectos Clínicos	13
1.2.3. Diagnóstico Laboratorial	14
1.2.3.1. Exame Físico	15
1.2.3.2. Exame Químico	15
1.2.3.3. Exame Citológico	16
1.2.3.4. Exame Bacteriológico	16
1.2.3.5. Testes Imunológicos	18
1.3. MÉTODO MOLECULAR	20
1.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	20
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. CEPAS-PADRÃO	26
3.2. CASUÍSTICA	26
3.2.1. Classificação dos Pacientes	27
3.3. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR-MULTIPLEX	29
3.4. EXTRAÇÃO DO DNA	29
3.4.1. Extração do DNA de Amostras de LCR e de Culturas Bacterianas	29

3.5. AVALIAÇÃO DOS “PRIMERS” DO MÉTODO DA PCR-MULTIPLEX	29
3.5.1. Estudo da Especificidade	29
3.5.2. Estudo da Sensibilidade	30
3.5.3. Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$)	30
3.5.4. Teste da Presença de Fatores Interferentes da PCR-Multiplex em Amostras de LCR	31
3.6. TÉCNICA DA PCR-MULTIPLEX	32
3.6.1. Reagentes Empregados	32
3.6.1.1. Tampão da PCR (10X)	32
3.6.1.2. Deoxinucleotídeos Trifosfatos (dNTPs)	32
3.6.1.3. “Primers”	32
3.6.1.4. DNA Polimerase	32
3.6.2. DNA das Amostras	32
3.6.3. Detecção do Produto Amplificado	33
3.6.4. Registro de Resultados	33
3.6.5. Controles da Técnica da PCR-Multiplex	33
3.7. TÉCNICA DA PCR-MULTIPLEX PADRONIZADA	33
3.7.1. Definição da Interpretação	33
3.8. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	34
4. RESULTADOS	35
4.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR-MULTIPLEX	35
4.1.1. Avaliação dos “Primers”	35
4.1.1.1. Estudo da Especificidade	35
4.1.1.2. Estudo da Sensibilidade	36
4.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $MgCl_2$	37
4.3. ESTUDO DA PRESENÇA DE FATORES INTERFERENTES DA PCR-MULTIPLEX	38
4.4. RESULTADOS OBTIDOS COM O MÉTODO DA PCR-MULTIPLEX NAS AMOSTRAS DE LCR	38

5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	57
7. RESUMO	58
8. ABSTRACT	60
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
10. ANEXOS	74

ABREVIATURAS E TERMOS UTILIZADOS NESTA DISSERTAÇÃO:

bp - pares de bases nitrogenadas

CIE - Contraimunoeletroforese

CoA - Coaglutinação com proteína A

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs - Deoxinucleotídeos Trifosfatos

16S rRNA - Ácido Ribonucleico da Subunidade Menor do Ribossomo

EIA - Enzima Imunoensaio

LA - Aglutinação por Partículas de Látex

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

LPS - Lipopolissacarídeo

Mab - Anticorpo Monoclonal

MME - Eletroforese de Enzima Multilocus

OMP - Proteína de Membrana Externa

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PFGE - Eletroforese em Campo Pulsado

RFLP - Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição

RNA - Ácido Ribonucleico

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Neisseria meningitidis* - ASPECTOS GERAIS

Neisseria meningitidis é um diplococo Gram-negativo pertencente à família *Neisseriaceae*, apresentando-se sob a forma de cocos arredondados ou ovalados com os lados achatados (reniforme) e aos pares, medindo aproximadamente 0,6 a 1,0 µm de diâmetro. São imóveis, não esporulados, capsulados, apresentam *pili* e são aeróbios ou anaeróbios facultativos (HOLT et al., 1994).

N. meningitidis ou meningococo foi observado pela primeira vez em 1887 por WEICHSELBAUM, quando estudava seis casos de meningite aguda.

Recentes estudos utilizando hibridização do DNA-rRNA e análise da seqüência 16S rRNA têm levado a uma reorganização taxonômica da família *Neisseriaceae*. Os gêneros *Moraxella* e *Acinetobacter* têm sido transferidos para a nova família *Moraxellaceae* e o gênero *Neisseria* diferenciado dos outros gêneros por parâmetros morfológicos e bioquímicos (HOLT et al., 1994; MURRAY, 1994).

O diagnóstico laboratorial de meningite bacteriana por *Neisseria meningitidis* é geralmente realizado por exame bacterioscópico, cultura em meios enriquecidos e ambiente especial, identificação bioquímica, sorológica, entre outros testes.

O meio rotineiramente utilizado para cultura de *Neisseria* do líquido cefalorraquidiano (LCR) é o ágar sangue de carneiro ou coelho (5%) ou ágar chocolate, cuja base é o meio de Müller Hinton e caldo de enriquecimento. O cultivo em placa é incubado por pelo menos 72 horas a 37 °C em atmosfera de 5 a 10 % de CO₂ com umidade, e o caldo enriquecido deve ser incubado a 37 °C por pelo menos 5 dias. No ágar sangue as colônias são transparentes, não pigmentadas e não hemolíticas. A probabilidade de detectar a bactéria pela cultura e microscopia aumenta quando a amostra de

LCR é concentrada por centrifugação (2.500 x g/15 min.) (ISENBERG et al., 1991, KNAPP et al., 1995).

1.1.1. Identificação Bioquímica

Para a identificação bioquímica de *N. meningitidis* são realizadas provas da oxidase (positiva), β -galactosidase (negativa) e produção de ácido a partir de carboidratos (oxidação), sendo diferenciada de outras espécies de *Neisseria* por oxidar a glicose e a maltose, e não oxidar a sacarose e a lactose.

1.1.2. Classificação

Os meningococos são classificados em sorogrupos, sorotipos, subtipos e imunotipos de acordo com a especificidade antigênica dos polissacarídeos e proteína de membrana externa (OMP), como está descrito na tabela 1.

Tabela 1. Determinantes Antigênicos de *Neisseria meningitidis*^a

Classificação Epidemiológica	Determinante Antigênico	Designação
Sorogrupo	Polissacarídeo capsular	A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y e Z
Sorotipo	OMP - classe 2/3 ^b	1, 2a, 2b, 2c, ..., 21
Subtipo	OMP - classe 1 ^b	P1.1, P1.2, ..., P1.16
Imunotipo	Lipopolissacarídeo	L1 - L12

a. Para a classificação completa das cepas de meningococos considera-se: B:15:P1.16:L3 (sorogrupo B, Sorotipo 15, Subtipo P1.16 e Imunotipo L3); a cepa pode expressar mais de um epitopo para o subtipo ou imunotipo, podendo ainda não ser identificada pelos anticorpos monoclonais disponíveis, neste caso denominada de NT.

b. Nem todos os números e letras, tais como: 1 a 21 e P1.1 a P1.16 são usados. VERHEUL et al. (1993).

Os grupos sorológicos estão subdivididos de acordo com a presença de antígenos polissacarídicos capsulares, sendo reconhecidos 13 sorogrupos: A, B, C, D, 29E (ocasionalmente denominado de Z'), H, I, K, L, W135, X, Y e Z, porém o sorogrupo D não está química e estruturalmente definido (ZOLLINGER, 1990).

Somente os sorogrupos A, B, C, Y e W135 têm sido relacionados à doença. Classicamente, os sorogrupos A e C são responsáveis por epidemias da doença meningocócica e os sorogrupos B e C são mais comuns em períodos interepidêmicos, embora também sejam implicados em epidemias. Atualmente, admite-se que o sorogrupo B seja responsável por microepidemias (DIAZ ROMERO & OUTSCHOORN, 1994).

A membrana externa do meningococo é composta de lipopolissacarídeos (LPS) e OMPs, também utilizados na classificação epidemiológica. Estas proteínas estão subdivididas em 5 diferentes classes estruturais correlacionadas aos seus pesos moleculares, sendo designadas de classe 1, 2, 3, 4, e 5. Todas as cepas de meningococo estruturalmente apresentam as proteínas de classe 2 ou 3 (VERHEUL et al., 1993).

O sorotipo é baseado nas OMPs de classe 2 e 3, codificadas pelo gene PorB, estabelecendo-se mais de 20 sorotipos diferentes de *N. meningitidis*; porém, os sorogrupos B e C não reagem com todos os sorotipos, assim como o sorogrupo A reage, principalmente, com anticorpos monoclonais específicos para apenas dois sorotipos, 4 e 21.

O subtipo está baseado nas OMPs de classe 1, codificado pelo gene PorA. Estas proteínas são imunogênicas para a produção de anticorpos bactericidas, sendo estudadas como antígeno para a vacina (CAUGANT et al., 1987). A subtipagem é usada para distinguir entre cepas que apresentam sorotipos similares (KERTESZ et al., 1993).

Tanto os sorotipos como os subtipos de cepas de meningococos associados com a doença variam de uma região geográfica para outra e, também, podem mudar em um período de tempo (FRASCH, 1987).

Os meningococos podem também ser classificados epidemiologicamente por imunotipos. Atualmente, são conhecidos 12

diferentes imunotipos, designados de L1 a L12 (VERHEUL et al., 1993). As diferenças entre esses imunotipos estão na porção oligossacarídica da molécula de LPS, e consiste em pequenas diferenças na sua estrutura, como por exemplo, na quantidade e localização dos grupos fosfoetanolamina, e também do grau de acetilação dos monossacarídeos (SAUNDERS et al., 1993). Os imunotipos L10 e L11 são prevalentes no sorogrupo A, enquanto que os imunotipos L1 à L9 são mais freqüentes nos sorogrupos B e C (SALIH et al., 1990).

Alguns métodos, além da análise antigênica, podem ser utilizados na caracterização epidemiológica das cepas de *N. meningitidis*, e dentre eles a eletroforese de enzimas multilocus (MME), análise de OMP, ribotipagem, reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em campo pulsátil (PFGE) e análise do polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) (KERTESZ et al., 1993; SWAMINATHAN et al., 1996; CAUGANT et al., 1987).

1.1.3. Patogenia

Neisseria meningitidis apresenta uma estrutura externa denominada de *pili* que permite à bactéria aderir-se às células da mucosa e, conseqüentemente, colonizar a nasofaringe. A distribuição ou presença de células receptoras específicas da mucosa ou do epitélio determina o tipo de colonização. Este conceito foi proposto para *Haemophilus influenzae* e *N. meningitidis* por STEPHENS & McGEE em 1981.

A porta de entrada, provavelmente, é o sítio por onde a bactéria penetra ativamente invadindo o tecido sub-epitelial, causando ou não danos à célula hospedeira, ou passivamente, por internalização em células epiteliais da nasofaringe, e atingindo a circulação sangüínea (STEPHENS et al., 1983).

Uma vez na corrente sangüínea, o meningococo poderá atingir as meninges desde que consiga ultrapassar as barreiras de defesas naturais do hospedeiro, tais como: fagocitose por leucócitos polimorfonucleares e

células reticuloendoteliais, lise pelo complemento e anticorpos específicos, atingindo assim o LCR (McGEE & BARINGER, 1990; TUNKEL et al., 1990; GRAY & FEDORKO, 1992). O espaço subaracnóideo e o LCR têm poucos mecanismos de defesa, contra a invasão de bactérias patogênicas, devido à escassez de células fagocitárias, baixa concentração de complemento e imunoglobulinas (McGEE & BARINGER, 1990; TUNKEL et al., 1990; GRAY & FEDORKO, 1992).

A invasão e multiplicação da bactéria no LCR resultam na inflamação aguda das meninges (meningite). Esta inflamação é iniciada pela presença de LPS bacterianos, ácidos teicóicos e/ou outros componentes da parede celular bacteriana, no espaço subaracnóideo. Estes antígenos bacterianos estimulam os monócitos a produzirem interleucina 1 e também estimulam macrófagos, astrócitos, células da micróglia, células endoteliais e células ependimais do sistema nervoso central (SNC) a produzirem citocinas e fator de necrose tumoral. O fator de necrose tumoral e a interleucina 1 agem em sinergismo trazendo a tona respostas inflamatórias que se manifestam clinicamente como meningite (GRAY & FEDORKO, 1992).

1.2. MENINGITE BACTERIANA

A meningite é um processo inflamatório das meninges que envolvem o SNC, podendo progredir rapidamente, conduzindo à seqüela permanente ou morte (GRAY & FEDORKO, 1992).

As meninges são formadas por três camadas que revestem o cérebro e a medula. São elas: dura-máter, aracnóide e pia-máter, que juntamente com o LCR são os sítios primários da infecção.

As meningites são denominadas de paquimeningite quando comprometem a dura-máter e, de leptomeningite, quando comprometem a pia-máter e aracnóide (GOMES, 1991). Geralmente, a meningite refere-se a um processo inflamatório da leptomeninge, isto é, forma-se exsudato inflamatório no espaço subaracnóideo. Quando a doença é provocada por

agente infeccioso detectável no LCR denomina-se meningite bacteriana (FARHAT, 1988).

A meningite epidêmica foi descrita por VIEUSSEUX em 1806 e ELISHA NORTH em 1811. Apesar do aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos e terapêuticos, a meningite bacteriana ainda é considerada uma das mais importantes doenças infecciosas, especialmente em crianças, por ser letal em muitos casos, além de resultar em seqüelas graves (MAJOR 1945; SCHELECH III, 1992). As seqüelas variam desde problemas de comportamento até danos cerebrais irreversíveis, muitas vezes progressivos, podendo ocorrer com freqüência de 30% a 50% dos casos (KILPI et al., 1993), especialmente em crianças e recém-nascidos (SAEZ-LLORENS & McCracken, 1990; SAEZ-LLORENS & McCracken, 1991). Assim sendo, é fundamental que o diagnóstico e o tratamento apropriado sejam específicos e rápidos (BERLOW et al., 1980).

No Brasil, o problema agrava-se devido ao baixo nível sócio-econômico e fatores determinantes como: a pobreza, a falta de higiene e desnutrição colaborando para a disseminação e instalação da meningite (GOMES, 1991).

1.2.1. Epidemiologia

Os agentes causadores da meningite bacteriana mais comuns no Brasil são a *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* (GOMES, 1991).

A meningite causada por *N. meningitidis* tem sido um dos problemas sérios de Saúde Pública, tanto em países desenvolvidos como em países com precárias estruturas sócio-econômicas.

Em 1986, nos Estados Unidos, *N. meningitidis* foi o terceiro agente causador mais freqüente de meningite bacteriana depois de *H. influenzae* e *S. pneumoniae*, sendo os sorogrupos B (48,4%) e C (46,4%) os mais prevalentes (WENGER et al., 1990). O uso de agentes antibacterianos de

largo espectro no tratamento das meningites tem reduzido drasticamente a mortalidade causada por esta doença. Todavia, tanto a incidência (0,2 a 6 casos/100.000 habitantes/ano) como a mortalidade (3% a 33%) das meningites bacteriana não tratada ou tratada inadequadamente permanece alta nos Estados Unidos (SAEZ-LLORENS & MCCRACKEN, 1990; SAEZ-LLORENS & MCCRACKEN, 1991; WISPELWEY et al., 1990).

A maior atenção dada à vigilância epidemiológica para a doença meningocócica na Itália, em 1985, resultou em menores taxas de infecção de 0,57/100.000 habitantes quando comparadas às dos Estados Unidos (STROFFOLINI et al., 1989). O sorogrupo C representa 72% dos casos na Itália, enquanto que o sorogrupo B, 25%. Este sorogrupo C parece ser de um único clone, como evidenciado pela técnica de “fingerprinting” (MASTRANTONIO et al., 1991).

Durante os últimos 20 anos a incidência da doença meningocócica, no Reino Unido e norte da Europa, vem aumentando especialmente na Noruega, onde uma epidemia causada principalmente pelo sorogrupo B, iniciada em 1974, culminou na região norte desse país entre os anos de 1974 e 1975, tendo a incidência de 26,3 casos/100.000 habitantes e uma taxa de casos fatais de 14,1% (BOVRE et al., 1977). Em 1992 a incidência da doença meningocócica era de 4,6 casos/100.000 habitantes, diminuindo em 1994 para 2,4 casos/100.000 habitantes, tanto do sorogrupo B como do C. No entanto, este declínio foi interrompido com o aumento da incidência do sorogrupo B em 1995, com taxa de 3,7 casos/100.000 habitantes (IVERSEN & AAVITSLAND, 1996).

A incidência anual notificada no Reino Unido, de 1 caso/100.000 habitantes, tem aumentado desde 1985, sendo associada ao sorogrupo B, que soma mais de 50% de todos os casos (JONES et al., 1988). Surtos devidos a esse sorogrupo tiveram início em 1981, em algumas regiões do Reino Unido (CARTWRIGT et al., 1986). Nos distritos de saúde de Gloucester, repetidos surtos alcançaram taxas de 5,5 casos/100.000 habitantes, porém em comunidades menores atingiu níveis altos de 56,5 casos/100.000 habitantes (STUART et al., 1987).

Na África, em 1989, ocorreu uma epidemia da doença meningocócica, principalmente nas regiões de Nairobi, Quênia e nordeste da Tanzânia, sendo relatados os casos devidos ao sorogrupo A. Em Nairobi, no período de abril a outubro, a taxa de incidência foi de 267 casos/100.000 habitantes, com ocorrência maior em crianças com idade entre 0 e 4 anos. Na Tanzânia, no período de julho a novembro do mesmo ano, ocorreram 1249 casos da doença meningocócica com taxa de incidência de 172 casos por 100.000 habitantes. Os programas de vacinação foram incluídos como medidas de controle da doença, e a incidência parece estar diminuindo (HAIMANOT et al., 1990).

Epidemias causadas por *N. meningitidis* foram identificadas, recentemente, no Nepal, Índia, Etiópia, Sudão e em outros países africanos. Na Índia a doença meningocócica é endemo-epidêmica, sendo que as últimas epidemias foram causadas pelo sorogrupo A. O sorogrupo B é raro, porém foi reportado um caso fatal de meningite por este sorogrupo em uma criança de 4 meses (SURI et al., 1994).

No Chile, a partir de 1981, observou-se um aumento do número de casos de infecções meningocócicas, especialmente nas regiões do norte do país. Entre 1982 e 1992 houve um incremento nas taxas de cerca de 0,186 casos/100.000 habitantes ao ano, sendo 55% do total de casos em menores de 5 anos. Destes, 21,9% eram menores de 1 ano e a taxa de letalidade de todos os casos foi de 73,7%. Em 1982 iniciou-se uma campanha de vacinação contra os sorogrupos A e C, observando-se, posteriormente, uma diminuição de casos de meningite meningocócica. Porém, no início de 1993 houve novamente um aumento no número de casos de meningite com predomínio do sorogrupo B em todo país, principalmente na região norte, com índice de letalidade de 31%. Contudo, a busca de serviços de saúde pela população resultou em diminuição da letalidade, estabilizando assim a epidemia (BROTE DE MENINGITIS MENINGOCOCICA EN CHILE, 1993).

A meningite meningocócica apresenta-se de forma endêmica nos grandes centros urbanos, assumindo a forma epidêmica em intervalos regulares, geralmente de 5 a 10 anos (MENINGITE MENINGOCÓCICA,

1990). É mais freqüente no outono e inverno, provavelmente devido à umidade do ar, temperaturas mais baixas e aglomerações em ambientes fechados, uma vez que a transmissão ocorre por via aérea.

As epidemias da doença meningocócica causada pelo sorogrupo A são mais graves, determinando altas taxas de incidência em períodos relativamente curtos, enquanto que as decorrentes dos sorogrupos B e C não atingem altas incidências mas são mais prolongadas (HAIMANOT et al., 1990).

A doença meningocócica acomete principalmente crianças e adultos jovens. A figura 1 mostra a distribuição etária dos casos no Brasil e os respectivos coeficientes de incidência por 100 mil habitantes, sendo que 65,75% dos casos ocorrem em crianças abaixo de 9 anos. Os coeficientes de incidência seguem o padrão normal, apresentando-se mais altos no grupo de menores de um ano, e caindo progressivamente com a idade. Como já vem ocorrendo desde 1986, praticamente não há queda entre os grupos de 10 a 14 e de 15 a 19 anos (DOENÇA MENINGOCÓCICA NO BRASIL, 1988).

Figura 1

A ocorrência da doença meningocócica no Brasil tem sido monitorada a nível nacional desde as epidemias causadas pelos sorogrupos A e C, ocorridas entre 1972 e 1974, quando foi relatada uma taxa de incidência de 179 casos/100.000 habitantes em 1974.

Em 1975 a população da Grande São Paulo foi vacinada contra os sorogrupos A e C e, em 1980, a taxa de incidência da meningite meningocócica manteve-se entre 1,0 e 1,4 casos/100.000 habitantes (DOENÇA MENINGOCÓCICA NO BRASIL, 1988).

As cepas do sorogrupo A foram isoladas na Grande São Paulo até 1982, e no período de 1981 a 1988 o sorogrupo B predominou (83%) enquanto que o sorogrupo C representou apenas 6% das amostras isoladas no mesmo período.

Em 1988 a incidência da doença meningocócica na Grande São Paulo foi de 4,06 casos/100.000 habitantes, sugerindo que uma nova epidemia estaria ocorrendo nesta região. Esta epidemia foi causada pelo sorogrupo B em 1988 e 1989 e pelos sorogrupos B e C a partir de 1990

(SÃO PAULO, CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA; SACCHI et al., 1994).

O Instituto de Infectologia Emílio Ribas, considerado como sendo o hospital de referência do Estado de São Paulo para vigilância epidemiológica de doenças infecto-contagiosas, atende aproximadamente 1000 casos de meningite por ano, provocadas principalmente por *N. meningitidis* (51,0%), *H. influenzae* (6,8%) e *S. pneumoniae* (4,1%), e cerca de 10% dessas meningites são de origem bacteriana não determinada. Excluindo os pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), aproximadamente 50% dos casos são causados por meningococo, representando cerca de 50% a 70% de todos os casos que ocorrem na Grande São Paulo (SÃO PAULO - INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS, 1988-1995).

No ano de 1997 na Grande São Paulo, ocorreram 1.172 casos de meningite meningocócica apresentando um coeficiente de incidência de 7,18 casos/100.000 habitantes com 14,9% de letalidade (SÃO PAULO, CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA).

Nos últimos anos, o aspecto epidemiológico da doença meningocócica tem apresentado uma predominância do sorogrupo B de *Neisseria meningitidis*, em substituição aos sorogrupos A e C, causadores da epidemia da década de 70 (Figura 2) (SÃO PAULO, CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 1970-1995).

Figura 2

A tendência projetada para o Instituto de Infectologia Emílio Ribas de São Paulo no período de 1960 a 1994 para a ocorrência das meningites causadas por meningococos, meningites de origem indeterminada e por outras etiologias está ilustrada na figura 3.

Figura 3. TENDÊNCIA PROJETADA PARA O INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS DE SÃO PAULO NO PERÍODO DE 1960 a 1994 PARA OCORRÊNCIA DAS MENINGITES

1.2.2. Aspectos Clínicos

Os sintomas clínicos da meningite bacteriana variam de acordo com o grupo etário e os sinais mais freqüentes são: febre, vômitos, cefaléia, sinais de irritação meníngea (rigidez de nuca) e os clássicos sinais de Kernig e Brudzinski, além de alterações sensoriais. Em recém-nascidos, prematuros e lactentes, as manifestações já não são bem definidas. Assim, no período neonatal a meningite bacteriana faz parte às vezes de um quadro septicêmico, com febre nem sempre presente, hipotermia em algumas ocasiões, cianose, convulsões, icterícia e respiração irregular (LONGO, 1988). O abaulamento e/ou aumento da tensão da fontanela pode caracterizar a doença, já que em recém-nascidos e lactentes jovens, os

sinais meníngeos tradicionais não são observados, daí a sua importância principalmente quando aliado à febre e vômitos (FARHAT, 1992).

A doença é de início agudo com febre alta persistente, acompanhada de sudorese, calafrios, delírio e, às vezes, convulsões. A cefaléia é de intensidade e localização variáveis, sendo um sintoma marcante desta enfermidade, junto com a febre e os vômitos em jato.

O quadro pode ser de instalação rápida, de algumas horas, ou lenta, acompanhada de outros sintomas, tais como fotofobia, inapetência, dores pelo corpo, raquialgia, mialgia e queda das acuidades visual e sensorial. O comprometimento do sensorio pode ir desde a irritabilidade e sonolência, até o delírio, torpor e coma. Convulsões são comuns em crianças, podendo constituir-se no primeiro sinal da doença.

A presença de lesões cutâneas petequiais e purpúricas acompanhada de outros sinais e sintomas clínicos sugere a etiologia meningocócica, também encontradas em meningites por outras etiologias, bem como em outras patologias não relacionadas.

1.2.3. Diagnóstico Laboratorial

Dificuldades são muitas nas técnicas bacteriológicas convencionais de diagnóstico devido à fatores, tais como, perda de viabilidade bacteriana no material clínico durante o transporte ou armazenamento inadequados, cultivo bacteriano demorado, além da terapia antibiótica anterior ao exame do LCR (DENIS et al., 1983; MELLES et al., 1984)

O exame do LCR é fundamental para se caracterizar o diagnóstico da meningite. A colheita da amostra do LCR é feita por punção a nível lombar, suboccipital ou ventricular (FARHAT, 1988). A análise laboratorial compreende: exames físicos, químicos, citológicos, bacteriológicos e imunológicos.

1.2.3.1. Exame Físico

O LCR em um indivíduo normal apresenta aspecto límpido e incolor e o volume normal varia de 80 a 150 mL, mantendo-se constante com renovação. Nos casos de meningite, o LCR pode apresentar-se límpido, purulento, turvo, hemorrágico ou xantocrômico (BRASIL, NORMAS TÉCNICAS PARA O DIAGNÓSTICO DAS MENINGITES BACTERIANAS, 1986).

A meningite bacteriana aguda é caracterizada pelo aspecto turvo ou purulento do LCR, enquanto que o hemorrágico ocorre por acidente de punção e por hemorragia meningoencefálica ou medular e o xantocrômico por hemólise intrarraquiana (FARHAT, 1992).

1.2.3.2. Exame Químico

- Dosagem de Glicose

A glicorraquia normal varia entre 50 a 70 mg/100 mL, representando aproximadamente dois terços da glicemia, estando em geral diminuída nas meningites bacterianas agudas

- Dosagem de Proteínas

A concentração de proteínas pode ter relação direta com a intensidade do processo infeccioso, mostrando uma elevação na concentração liquórica. Nas meningites bacterianas a concentração proteica geralmente está aumentada (valor normal: 30 mg/100 mL).

- Dosagem de Globulinas

O LCR com concentração de proteínas aumentada determina a positividade das reações para globulinas. A porcentagem de proteínas ligeiramente elevada tem valor diagnóstico.

- Dosagem de Cloretos

A concentração líquórica dos cloretos está relacionada com a osmolaridade do meio intracelular e as alterações do equilíbrio ácido-básico. A diminuição da concentração de cloreto no LCR tem relativo valor diagnóstico, somente nos casos de neurotuberculose. Os níveis normais variam desde 720 a 750 mg/100mL.

1.2.3.3. Exame Citológico

O exame citológico deve ser quantitativo e cito-morfológico, sendo realizada a contagem de células e hemácias, e o resultado expresso em número de elementos por milímetro cúbico. Normalmente, quatro células/mm³ constituem o limite máximo em indivíduos sadios, sendo que este número pode chegar a trinta células em recém-nascidos.

Assim, a neutrofilia pode ser indicativa de meningite aguda de etiologia bacteriana, enquanto que a reação celular do tipo linfomonocitária é mais comum em meningites crônicas de diversas etiologias, meningite bacteriana em evolução e meningite viral.

1.2.3.4. Exame Bacteriológico

O exame bacteriológico tem por finalidade pesquisar o agente etiológico no LCR, e seus resultados são dependentes de diversos fatores: tempo decorrido da punção para realizar o diagnóstico, métodos utilizados para cultivo, meios de cultura adequados, armazenamento de amostras e uso de antibiótico anterior à obtenção da amostra.

- Microscopia

A microscopia direta é um método simples, rápido e barato para detecção de bactérias. A coloração de Gram, baseada nas afinidades

tintoriais da parede celular, geralmente é mais confiável para detectar concentrações $\geq 10^5$ bactérias/mL de amostra. A bactéria tem sido observada em 75% dos casos das meningites bacterianas agudas (GRAY & FEDORKO, 1992).

Outra coloração que pode ser utilizada é o alaranjado de acridina, um fluorocromo que se intercala no ácido nucleico do microrganismo. Em pH ácido (4,0) a bactéria torna-se vermelho brilhante e os leucócitos verdes. LAUER et al. (1981) mostraram que o alaranjado de acridina foi mais sensível (82,2%) que a coloração de Gram (76,7%), sendo o primeiro método de coloração capaz de detectar bactérias na concentração $\geq 10^4$ bactérias/mL. A maior vantagem do alaranjado de acridina é o fato de ser mais sensível que a coloração de Gram na detecção de bactérias, tanto intra como extracelulares, mesmo em LCR de pacientes que já tenham recebido terapia antimicrobiana (KLEIMAN et al., 1984).

O método de “Quellung” ou intumescimento capsular, embora raramente empregado em exames rotineiros, pode ser utilizado para confirmar a presença de organismos com morfologia típica, como *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* ou *H. influenzae* b. Nesta reação, o anti-soro específico para o polissacarídeo capsular e a amostra clínica são saturados com azul de metileno em uma lâmina de microscópio, sendo posteriormente observada sob objetiva de imersão. A formação de complexos antígeno-anticorpo na superfície da bactéria induz mudanças nos índices de refração da cápsula. Microscopicamente, as cápsulas são claras e de tamanho aumentado. O teste requer anticorpos altamente específicos, com altos títulos (FACKLAM et al., 1991).

- **Cultura**

O cultivo dos microrganismos, em condições ótimas, é um pré-requisito para o diagnóstico adequado. Para que isto possa ser realizado, é necessário o conhecimento de suas exigências nutritivas e das condições físicas requeridas. As bactérias causadoras de meningite são sensíveis às variações de temperatura e umidade, portanto, para se comprovar a

presença do agente etiológica através da cultura e identificação no LCR é necessária para uma conservação adequada do material coletado, cuidado no transporte e escolha de meios adequados à cultura.

1.2.3.5. Testes Imunológicos

Várias técnicas imunológicas foram desenvolvidas e propostas para detecção rápida de antígenos bacterianos diretamente no LCR, muitas destas comercializadas em formas de “Kits” para serem utilizadas como subsídio diagnóstico rápido da meningite, porém, necessitam de pelo menos 10^3 - 10^4 UFC para fornecer uma reação positiva (OLCÉN et al., 1995).

- Contraimunoeletroforese (CIE)

A CIE é um método rápido importante no diagnóstico de meningite bacteriana. Este método consiste na aplicação de uma corrente elétrica para acelerar a imunodifusão em ágar ou em acetato de celulose do antígeno em direção ao anticorpo, sendo capaz de produzir uma imunoprecipitação que é completada em 30 a 60 minutos.

Este método é menos utilizado por necessitar de anti-soro de alta qualidade, além de ser mais trabalhoso e menos sensível quando comparado aos outros métodos diagnósticos (FACKLAM et al., 1991; ALKMIN, 1992).

- Coaglutinação com Proteína A (CoA)

Os reagentes para CoA são compostos de suspensão de *S. aureus* que contém a proteína A, uma proteína com peso molecular de 12.000 a 43.000 que está covalentemente ligada ao peptidoglicano da bactéria.

As moléculas de imunoglobulina G soro-específicas ligam-se à proteína A pela sua porção Fc e a porção Fab permanece livre para reagir

com o antígeno específico. Na presença do antígeno específico, há uma visível aglutinação da suspensão estafilocócica (GRAY & FEDORKO, 1993).

- Aglutinação por Partículas de Látex (LA)

Este método utiliza partículas de látex sensibilizadas com anticorpos específicos adsorvidos em sua superfície para detecção do antígeno diretamente em amostras clínicas. Em presença do antígeno homólogo, ocorre uma aglutinação visível.

Comparado às técnicas bacteriológicas clássicas, este método permite a detecção indireta do agente infeccioso e é bastante útil no diagnóstico de urgência, podendo ser aplicada ainda em amostras de sangue e LCR (AKOUA-KOFFI et al., 1984; CAMARGOS et al., 1994). A sensibilidade desta técnica varia de 55% a 100% para os diferentes testes comerciais estudados em amostras de LCR (BALLARD et al., 1987).

Os métodos de LA e CoA são mais sensíveis que o de CIE, porém menos específicos, sendo portanto mais indicados como métodos de triagem. Tais técnicas apresentam vantagens como métodos rápidos para diagnóstico laboratorial, sendo de fácil realização, não requerendo equipamentos especiais (GRAY & FEDORKO, 1992).

- Ensaio Imunoenzimático (EIA)

As técnicas imunoenzimáticas são muito empregadas para a detecção de antígenos bacterianos e utilizam, em geral, anticorpos específicos ligados a um suporte sólido. Se o antígeno bacteriano homólogo estiver presente na amostra clínica, este se ligará ao anticorpo imobilizado. A sensibilidade destes testes em amostras de pacientes com suspeita clínica de meningite é de 89% a 100% para *N. meningitidis*, podendo detectar antígenos bacterianos em concentrações de 0,1 a 5 ng/mL (ALKMIN, M. G. A., 1992).

Geralmente, estes métodos tomam mais tempo, exigem equipamentos especializados, necessitam de vários controles, sendo portanto, mais vantajosos em inquéritos epidemiológicos (BEUVERY et al., 1979).

1.3. MÉTODO MOLECULAR

Os procedimentos de amplificação podem ser usados para superar as limitações dos ensaios de hibridização de sondas. Um grande número de sistemas tem sido descrito, fazendo-se uso do mecanismo de replicação *in vivo* para estabelecer o efeito de amplificação dos ácidos nucleicos *in vitro*. Vários métodos foram desenvolvidos permitindo sua adaptação em rotina diagnóstica.

1.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O desenvolvimento da técnica de amplificação de fragmentos de DNA utilizando a reação em cadeia da polimerase abriu enormes perspectivas para a análise de mutações de genes, possibilitando o diagnóstico precoce de doenças genéticas, detecção de agentes etiológicos de processos infecciosos, entre outros.

A PCR é uma técnica de amplificação *in vitro* de uma determinada região de ácidos nucleicos (DNA alvo), cuja especificidade é determinada pela escolha adequada de “primers” ou iniciadores que são pequenos fragmentos sintetizados complementares à sequência do fragmento do DNA a ser amplificado (SAIKI et al., 1985).

Introduzida por MULLIS & FALOONA (1987), esta técnica permite replicar o DNA alvo a cada ciclo, reproduzindo, assim, milhões de cópias de um segmento selecionado ao final da reação.

As três etapas de amplificação, denominadas de ciclo, consistem em: 1) desnaturação ou “melting”, que ocorre em temperaturas elevadas (90 a 95 °C), separando a fita dupla de DNA em duas fitas simples; 2) “annealing”, em que ocorre a hibridização entre os “primers” e o DNA alvo (45 a 60 °C); 3) extensão (polimerização), na qual ocorre a cópia do fragmento de interesse pela DNA polimerase, que reconhece a extremidade do “primer” iniciando a reação pela extremidade 3', ligando-se aos nucleotídeos complementares ao DNA alvo (SAIKI et al., 1988).

Os primeiros experimentos de PCR foram realizados com o fragmento de Klenow da DNA Polimerase I de *E. coli*. Nesse caso, a cada passo de desnaturação a enzima era inativada e mais enzima deveria ser adicionada.

Posteriormente, passou-se a utilizar a DNA Polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus* (Taq DNA Polimerase), uma enzima termoestável, não havendo a necessidade de adicionar mais enzima após cada ciclo de desnaturação, permitindo, assim, a automatização da técnica e o seu emprego na detecção de DNA de agentes etiológicos causadores de infecções.

Como a meningite bacteriana deve ser tratada de imediato, faz-se necessário o emprego de métodos de detecção rápida e específica para o diagnóstico clínico (KARCH et al., 1995). Dessa forma, a PCR tem sido empregada para amplificar e detectar DNA de vários microrganismos. Além da alta sensibilidade, a vantagem deste método é a detecção de bactérias mortas ou inibidas pelo uso de antibiótico. Até o momento, o método mais específico para detectar o patógeno bacteriano é a cultura seguida da identificação bioquímica e sorológica, que necessita de pelo menos 48 horas de incubação, porém, nem sempre o crescimento é observado (LEONG & GREISEN, 1993; GREISEN et al., 1994; OLCÉN et al., 1995).

Atualmente, para o diagnóstico de *N. meningitidis* por PCR principalmente no que se refere à escolha da região do genoma a ser amplificado, estão sendo sugeridas várias estratégias, descritas na tabela 2.

Tabela 2. ESTRATÉGIAS DESCRITAS PARA O DIAGNÓSTICO DE *N. meningitidis* quanto à escolha da região genômica a ser amplificada.

Referência	Alvo	PCR (+) / Cultura (+)	PCR (+) / Cultura (-)
KRISTIANSEN et al., 1991 (1 amostra)	Gene dihidropteroato sintetase (dhps)	0/1	1/1
NI et al., 1992 (15 amostras)	IS1106	10/11	0/4
KERTESZ et al., 1993 (54 amostras)	Proteína de membrana externa classe 1 (gene porA)	45/45	0/45
LEONG & GREISEN, 1993	16S rRNA	Estudo com cepas padrão	Estudo com cepas padrão
RADSTRÖM et al., 1994 (8 amostras)	16S rRNA	8/8	0/8
SURI et al., 1994 (1 amostra)	Gene dihidropteroato Sintetase (dhps)	1/1	0/0
KRISTIANSEN et al., 1995	Gene dihidropteroato sintetase (dhps)	Estudo com cepas padrão	Estudo com cepas padrão
OLCÉN et al., 1995	16S rRNA	Estudo com cepas padrão	Estudo com cepas padrão
CAUGANT et al., 1996 (37 amostras)	Proteína de membrana externa classe 1 (gene porA)	15/16	15/21
NEWCOMBE et al., 1996 (53 amostras)	IS1106	25/25	15/28
BORROW, et al., 1997	Gene siaD	17/21	0/0
SAUNDERS, et al., 1997	Gene porA	29/30	0/18

O DNA de *Neisseria meningitidis* pode ser detectado por “primers” que codificam o gene dihidropteroato sintetase que caracteriza a cepas sensíveis ou resistentes às sulfonamidas (KRISTIANSEN et al., 1991; SURI et al., 1994; KRISTIANSEN, et al., 1995), “primers” específicos complementares à seqüência de inserção IS1106 (NI et al., 1992; NEWCOMBE et al., 1996), “primers” que amplificam um fragmento do gene porA que codifica um antígeno proteico componente importante no estudo do desenvolvimento de vacinas (KERTESZ et al., 1993; CAUGANT et al., 1996; SAUNDERS et al., 1997), “primers” que codificam o gene siaD da sialiltransferase (BORROW et al., 1997) e também “primers” da seqüência 16S do rRNA bacteriano (LEONG & GREISEN, 1993; GREISEN et al., 1994; RADSTRÖM et al., 1994; OLCÉN et al., 1995) que pode ser uma alternativa para o diagnóstico desse agente etiológico, uma vez que são extensivamente utilizados para avaliação tanto filogenética como evolutiva (RELMAN, 1993).

Os genes da região 16S rRNA acumulam baixa freqüência de mutações numa taxa constante sobre o tempo e por esta razão podem ser usados como “molecular clocks” (WOESE, 1987). Todas as moléculas 16S do rRNA apresentam estruturas constantes, ou seja, regiões de seqüências extremamente conservadas alternadas com regiões variáveis entre as espécies, mas constantes na mesma espécie, sendo encontradas em todas as bactérias conhecidas. Portanto, “primers” que reconheçam estas seqüências de genes da região 16S do rRNA podem ser desenhados e utilizados na amplificação gênica para identificar seqüências específicas da bactéria na amostra de LCR e posteriormente, numa segunda etapa, detectada pela hibridização com sondas específicas (LEONG & GREISEN, 1993; GREISEN et al., 1994) ou realizando nova amplificação por PCR-“seminested” (RADSTRÖM et al., 1994; OLCÉN et al., 1995).

A gravidade da enfermidade por causa da sua letalidade e alto grau de seqüelas neurológicas justifica uma especial atenção para um diagnóstico clínico-laboratorial rápido.

A identificação do agente etiológico causador das meningites bacterianas é de fundamental importância para a conduta clínica adequada, sendo assim, há necessidade de técnicas diagnósticas confiáveis, precisas e rápidas (KALDOR et al., 1977).

N. meningitidis tem sido o agente etiológico mais freqüente como causador das meningites bacterianas no Brasil, e devido às dificuldades inerentes ao seu diagnóstico, é necessária a aplicação de técnicas laboratoriais mais sensíveis e específicas para a sua detecção. Dessa forma, a PCR poderá constituir o método de escolha para o diagnóstico precoce e alternativo aos convencionais, contribuindo para fornecer importantes subsídios para o diagnóstico desta patologia, principalmente naqueles casos em que há suspeita clínica da doença e os testes empregados rotineiramente não consigam revelar o agente em pacientes tendo administração prévia de drogas antimicrobianas.

Desde que o comércio não dispõe de “kits” diagnósticos utilizando a PCR, realizamos a padronização de um método de amplificação, adotando uma estratégia que permita detectar o fragmento universal comum a todas as bactérias e, simultaneamente o fragmento específico para *N. meningitidis* para utilização em laboratórios de Saúde Pública. Este sistema denomina-se PCR-Multiplex e foi proposto para a realização do presente trabalho com base nos estudos de LEONG & GREISEN (1993) e GREISEN et al. (1994).

A estratégia do emprego de “primers” proposta nesta técnica de PCR-Multiplex, não foi ainda descrita na literatura, e possibilita a redução de tempo desde que a detecção e a identificação do agente é efetuada em uma única etapa de amplificação, diferindo das demais PCR.

2. OBJETIVOS

- Padronizar o método da PCR-Multiplex aplicado ao diagnóstico da meningite meningocócica.
- Testar amostras de LCR de pacientes com e sem suspeita de meningite meningocócica, empregando o método padronizado.
- Correlacionar e avaliar os resultados obtidos pela técnica da PCR-Multiplex com os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes, determinando a sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo do método.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CEPAS-PADRÃO

Foram utilizadas as cepas-padrão de *Neisseria meningitidis* sorogrupos A (CDC 1894), B (CDC 2991), C (CDC 1628) e W135 (Marseille) cedidas gentilmente pelo pesquisador Cláudio T. Sacchi do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Além de *N. meningitidis*, foram empregadas outras cepas bacterianas que poderiam estar envolvidas em casos de meningite bacteriana, tais como: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 11111), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 33400), *Haemophilus influenzae* (ATCC 10211) e *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).

As técnicas de lise e extração do DNA foram padronizadas a partir destas culturas bacterianas.

3.2. CASUÍSTICA

Foram estudadas amostras de LCR de 168 pacientes provenientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) - São Paulo e do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Todas as amostras colhidas foram cadastradas e submetidas aos testes laboratoriais convencionais de rotina que compreenderam: exame físico-químico, citológico, bacteriológico e imunológico.

O exame físico das amostras compreendeu da análise da cor, aspecto e volume do LCR recebido. No exame químico foram determinadas as concentrações de glicose, proteína e cloreto.

Os testes bacteriológicos realizados foram: o exame direto, pelo método da tinta da China, coloração de Gram e cultura. As amostras de LCR foram semeadas em placas contendo ágar sangue (5%), empregando o ágar Mueller Hinton como base, incubadas à 37 °C em ambiente de 5% de CO₂.

Para os testes imunológicos, foram utilizados os sobrenadantes das amostras de LCR. A LA foi realizada utilizando-se os produtos comerciais: Meningo Slidex - Biolab Mérieux específicos para: *Neisseria meningitidis* sorogrupos A, B e C, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* e Latex-Cripto Antigen Detection System - Immuno-Mycologics específico para *Cryptococcus neoformans*. Para a CIE foram utilizados soros específicos contra as mesmas bactérias submetidas ao teste de LA, incluindo o sorogrupo W135 de *N. meningitidis* (ALKMIN et al., 1996) realizada no Instituto Adolfo Lutz.

Após o processamento das amostras de LCR, segundo as metodologias acima descritas, uma alíquota de cada amostra de aproximadamente 500 µL, foi conservada à - 40 °C para posterior realização da PCR.

3.2.1. Classificação dos Pacientes

Os pacientes foram classificados de acordo com resultados clínicos e laboratoriais convencionais (NI et al. 1992), conforme os critérios abaixo relacionados:

A. Quadro clínico de pacientes compatível ou não com meningite bacteriana aguda

B. Líquido Cefalorraquidiano: - celularidade (> ou < 4 células/mm³)

- polimorfonucleares
- população linfomonocitária
- proteína (> ou < 40 mg/mL)
- glicose (> ou < 30 mg/mL)

- C. Cultura de LCR para *N. meningitidis*
- D. Bacterioscopia para diplococos Gram-negativos (coloração de Gram)
- E. LA para *N. meningitidis*
- F. Reação de CIE para *N. meningitidis*

De acordo com estes critérios, os pacientes foram classificados em 5 grupos:

GRUPO I (A+B+C+D+E+F) n=19 pacientes

Pacientes com sintomatologia clínica de meningite bacteriana aguda, cuja cultura do LCR tenha confirmado isolamento de *Neisseria meningitidis*.

GRUPO II (A+B+D e/ou E, F) n=65 pacientes

Pacientes com sintomatologia clínica de meningite bacteriana aguda, cujo exame bacteriológico do LCR não tenha revelado crescimento de *N. meningitidis*.

GRUPO III (A+B) n=27 pacientes

Pacientes com sintomatologia clínica de meningite bacteriana aguda, porém com cultura e bacterioscopia do LCR negativas.

GRUPO IV (A+B) n=20 pacientes

Pacientes com quadro clínico de meningite bacteriana aguda por outros agentes bacterianos não relacionados com *N. meningitidis*.

GRUPO V n=37 pacientes

Pacientes sem patologias de infecção bacteriana, alguns com diagnóstico de tumor e outros com diferentes infecções virais.

3.3. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR-MULTIPLEX

Na fase de padronização, as condições ótimas para extração de DNA utilizando cepas-padrão, além do estudo dos “primers”, concentração de reagentes, preparo das amostras clínicas, bem como do ciclo térmico para amplificação dos fragmentos, foram estudadas baseando-se nos trabalhos, como abaixo discriminados.

3.4. EXTRAÇÃO DO DNA

3.4.1. Extração do DNA de Amostras de LCR e de Culturas Bacterianas

As amostras de LCR foram submetidas à extração do DNA de acordo com o método descrito por KERTESZ et al., 1993. Aproximadamente 500 µL da amostra de LCR foi centrifugada em tubo tipo Eppendorff (4.000 g/5 min). O sedimento foi ressuspenso em 100 µL da solução de lise (100 mM de Tris-HCl; 25 mM de MgCl₂; 500mM de KCl; 5% de Nonidet P-40; 5% de Tween 20; 1 mg/mL de gelatina; 400 ng/mL de Proteinase K) e incubado à 56 °C por 20 min. e à 95 °C por 10 minutos para inativar a Proteinase K.

Foram ainda ensaiados os processos de extração descritos por SCHOOLNIK (1980), ZHANG et al. (1990) e PIERRE et al. (1991).

3.5. AVALIAÇÃO DOS “PRIMERS” DO MÉTODO DA PCR-MULTIPLEX

3.5.1. Estudo da Especificidade

Os “primers” escolhidos foram: DG74, RW01 e COR28. Utilizamos os “primers” universais que amplificam a região 16S rRNA que apresentam regiões altamente conservadas, sendo encontradas em todas as bactérias

conhecidas, descritos por LEONG & GREISEN (1993) e GREISEN et al. (1994), designados de RW01, DG74. Para a amplificação do fragmento espécie-específico de *N. meningitidis* utilizamos os “primers” RW01 e COR28 em uma única reação de amplificação. Para estudar a especificidade dos mesmos foi empregado o DNA extraído da cultura de cepas-padrão não relacionadas às de *N. meningitidis*.

3.5.2. Estudo da Sensibilidade

Após o crescimento das cepas-padrão de *N. meningitidis* por 24 horas foi preparada uma suspensão bacteriana em 10 mL de solução fisiológica (0,85% de NaCl), equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland, com concentração aproximada de 10^8 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

Desta suspensão foram preparadas concentrações decrescentes de 10^7 a 10^0 UFC/mL e 100 μ L de cada diluição foram semeadas em placa de ágar sangue com alça de Drigalsky, para posterior contagem do número de colônias, após 24 e 48 horas de incubação.

Comprovada a quantidade de bactérias em cada diluição, procedeu-se à extração do DNA de uma alíquota de 1 mL de cada uma das suspensões bacterianas e a PCR-Multiplex foi realizada como acima descrito.

3.5.3. Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$)

A PCR é uma reação enzimática catalizada pela polimerase, e sua atividade depende de íons magnésio; portanto, a variação da concentração do cloreto de magnésio no tampão pode interferir na reação.

Para a determinação da concentração ótima do cloreto de magnésio, foram numerados 7 tubos acrescidos de água Mili Q estéril e $MgCl_2$ (100 mM) de acordo com o protocolo descrito:

TUBO	ÁGUA Mili Q (μL)	MgCl ₂ [100 mM] (μL)
1	9,0	0,0
2	7,5	1,5
3	6,0	3,0
4	4,5	4,5
5	3,0	6,0
6	1,5	7,5
7	0,0	9,0

A solução empregada na amplificação dos fragmentos de DNA (PCR-MIX) foi preparada sem cloreto de magnésio nas seguintes proporções para cada tubo contendo volume final de 100 μL:

80 μL do tampão sem cloreto de magnésio (10 x)

80 μL de dNTP-MIX (2 mM)

8 μL de cada “primer”

544 μL de DNA template (15 μg/mL)

A cada tubo foram adicionados 90 μL da solução PCR-MIX preparada com Tampão 10X, (sem MgCl₂), dNTP-MIX, “primers” e DNA de *N. meningitidis*. Os sete tubos foram incubados no termociclador (Perkin Elmer 9600) à 95 °C por 5 min. Após este aquecimento inicial o aparelho foi programado para 30 ciclos (94 °C/1 min., 56 °C/1 min., 72 °C/1 min.), incluindo mais 10 minutos à 72 °C para completar a extensão dos “primers” e mantidos à 4°C. O tempo gasto para realização de teste é de 5 a 6 horas.

3.5.4. Teste da Presença de Fatores Interferentes da PCR-Multiplex em Amostras de LCR

As amostras de LCR suspeitas que não apresentaram produto amplificado foram testadas quanto à presença de inibidores da reação, pela adição de aproximadamente 100 pg de DNA de *N. meningitidis* (cepas-padrão sorogrupos A, B, C, ou W135).

3.6. A TÉCNICA DA PCR-MULTIPLEX

3.6.1. Reagentes Empregados

3.6.1.1. Tampão da PCR (10X)

Foi preparado na seguinte composição: 100 mM de Tris-HCl (SERVA Lab.), pH 8,3; 500 mM de KCL (Merck); 1 mg/mL de gelatina (SIGMA) e utilizado em uma concentração final 10 vezes menor.

3.6.1.2. Deoxinucleotídeos Trifosfatos (dNTPs)

Foram utilizados 10 mM de dNTPs (Pharmacia Biotech) para uma concentração final de 2 mM.

3.6.1.3. “Primers”

Os “primers” DG74 e COR28 foram utilizados em uma concentração final de 1 pmol/μL e o “primer” RW01 de 2 pmol/μL (Pharmacia Biotech).

3.6.1.4. DNA Polimerase

Foi utilizada a Taq DNA Polimerase da Pharmacia Biotech, na concentração final de 2,0 unidades (U) para cada tubo de reação.

3.6.1.5. Cloreto de Magnésio

O cloreto de magnésio foi preparado na concentração de 100 mM e utilizado na concentração final de 3,0 mM.

3.6.2. DNA das Amostras

Após a extração do DNA das amostras de LCR, estes foram quantificados no espectrofotômetro capilar (260 nm) GeneQuant da Pharmacia, e aproximadamente 10 ng foram utilizados em cada teste.

3.6.3. Detecção do Produto Amplificado

O produto amplificado foi detectado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (SIGMA) em TBE (Tris-ácido bórico-EDTA), corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado sob luz UV.

3.6.4. Registro de Resultados

Os géis de agarose foram fotografados com câmera Polaroid modelo DS-34 e filme 667 para análise e documentação.

3.6.5. Controles da Técnica da PCR-Multiplex

A cada amplificação realizada foram utilizados três controles: o negativo, constituído de amostras de LCR de pacientes que não apresentavam meningite bacteriana, o branco da reação ou controle do teste, preparado com água Mili Q estéril e os demais reagentes e o controle positivo, com amostras de pacientes com meningite meningocócica.

3.7. TÉCNICA DA PCR-MULTIPLEX PADRONIZADA

Determinadas as condições ótimas da técnica padronizada, definiu-se a interpretação dos fragmentos amplificados.

3.7.1. Definição da Interpretação

No diagnóstico da meningite meningocócica empregando a técnica da PCR-Multiplex, os resultados foram considerados como sendo positivos quando os fragmentos de 370 bp e 279 bp eram revelados. Não obstante quando apenas um único fragmento de 370 bp era revelado, o resultado foi interpretado como sendo negativo para meningite meningocócica, mas

indicando a presença de bactérias não relacionadas com *N. meningitidis*.

3.8. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

O desempenho diagnóstico da PCR foi avaliado em termos de sensibilidade, especificidade, eficiência e valores preditivos de resultados positivos e negativos, valores esses calculados segundo GALEN & GAMBINO (1975) e, os intervalos de confiança em nível de 95%, determinados segundo WILSON como citado por ROTHMAN & BOICE (1982).

4. RESULTADOS

4.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR-MULTIPLEX

Diferentes fatores que influenciam na reação de amplificação e as condições ótimas selecionadas já estão mencionadas nos itens 3.4 e 3.5. Os demais resultados obtidos estão abaixo apresentados.

4.1.1. Avaliação dos “Primers”

4.1.1.1. Estudo da Especificidade

Os “primers” escolhidos DG74, RW01 e COR28 mostraram alta especificidade em relação às cepas de cultura de *N. meningitidis*, pois os dois primeiros amplificaram fragmento universal de 370 bp e, o terceiro apresentou especificidade somente para o meningococo, 279 bp, ilustrados nas figuras 4 e 5.

Figura 4. Especificidade dos “primers” (RW01, DG74 e COR28). Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com as amostras pós-PCR, coluna 1 - padrão de peso molecular (100 bp); colunas 2, 3, 5 e 7 - *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*; colunas 4, 6 e 8 - *N. meningitidis* A, B e C, respectivamente.

Figura 5. Especificidade dos “primers” (RW01, DG74 e COR28). Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com as amostras pós-PCR, coluna 1 - padrão de peso molecular (100 bp); colunas 2, 3, 5, 6 e 7 - *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Mycobacterium tuberculosis*; colunas 4 e 8 - *N. meningitidis* B e W135, respectivamente.

4.1.1.2. Estudo da Sensibilidade

As alíquotas das diferentes concentrações 10^0 a 10^6 da suspensão por mL de cultura de *N. meningitidis*, que foram submetidas à lise bacteriana para a extração do DNA, apresentaram o fragmento de 370 bp universal bacteriano amplificado após a PCR, em todas as concentrações. O fragmento de 279 bp específico correspondente a *N. meningitidis* não foi amplificado na menor concentração, ou seja, 10^0 , como mostra a figura 6.

Figura 6. Sensibilidade dos “primers” (RW01, DG74 e COR28). Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com as amostras pós-PCR: coluna 1 - padrão de peso molecular (100 bp); colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 - concentrações de *N. meningitidis* 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 por mL, respectivamente.

4.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $MgCl_2$

Para a determinação da concentração ótima de cloreto de magnésio para o uso, foram testadas as concentrações de 1,5 mM a 9,0 mM (tubos 1 a 7) para a técnica da PCR. Os resultados mostraram diferenças significativas entre os tubos 3 e 4 quanto à intensidade nas concentrações finais de 1,5 e 3,0 mM. Optamos assim, pela concentração final de 3,0 mM, ilustrada na figura 7.

Figura 7. Diferentes concentrações de cloreto de magnésio. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com as amostras pós-PCR. Coluna 1, padrão de peso molecular (100 bp); coluna 2, controle negativo; colunas 3, 4, 5, 6, 7 e 8, amostras de cloreto de magnésio com 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 e 9,0 mM, respectivamente.

4.3. ESTUDO DA PRESENÇA DE FATORES INTERFERENTES DA PCR-MULTIPLEX

As amostras de LCR que apresentaram resultados negativos nos métodos estudados: Coloração de Gram, CIE, LA e cultura, processadas novamente com a adição de 10 ng do DNA de *N. meningitidis*, amplificaram os dois fragmentos (universal e espécie-específico), mostrando a ausência de inibição com fatores interferentes.

4.4. RESULTADOS OBTIDOS COM O MÉTODO DA PCR-MULTIPLEX NAS AMOSTRAS DE LCR

Os dados obtidos no estudo das amostras de LCR, na reação de PCR-Multiplex, estão condensados nas tabelas 3 a 6 e nas figuras 8 a 10.

Tabela 3. RESULTADOS OBTIDOS NA PCR-MULTIPLEX EM COMPARAÇÃO COM TÉCNICAS CONVENCIONAIS PARA O DIAGNÓSTICO DA MENINGITE MENINGOCÓCICA, NO ESTUDO DE 168 AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES PERTENCENTES A DIFERENTES GRUPOS

GRUPO	AMOSTRAS	TESTES	POSITIVIDADE (%)
I	19	PCR-MULTIPLEX	•Universal •N.m.
			100 (19/19) 100 (19/19)
		CULTURA	100 (19/19)
		BACTERIOSCO	84,2 (16/19)
		PIA	84,2 (16/19)
II	65	LÁTEX	42,1 (8/19)
		CIE	
		PCR-MULTIPLEX	•Universal •N.m.
			100 (65/65) 89,2 (58/65)
		CULTURA	0 (0/65)
III	27	BACTERIOSCO	100 (65/65)
		PIA	27,7 (18/65)
		LÁTEX	13,8 (9/65)
		CIE	
		PCR-MULTIPLEX	•Universal •N.m.
IV	20		89,0 (24/27) 51,8 (14/27)
		CULTURA	0 (0/27)
		BACTERIOSCO	0 (0/27)
		PIA	0 (0/27)
		LÁTEX	0 (0/27)
V	37	CIE	
		PCR-MULTIPLEX	•Universal •N.m.
			100 (20/20) 0 (0/20)
		CULTURA	0 (0/20)
		BACTERIOSCO	0 (0/20)
Total	168	PIA	0 (0/20)
		LÁTEX	0 (0/20)
		CIE	
		PCR-MULTIPLEX	•Universal •N.m.
			0 (0/37) 0 (0/37)
		CULTURA	0 (0/37)
		BACTERIOSCO	0 (0/37)
		PIA	0 (0/37)
		LÁTEX	0 (0/37)
		CIE	0 (0/37)

A técnica da PCR-Multiplex apresentou positividade de 100% nas amostras de LCR pertencentes aos pacientes com meningite meningocócica comprovada, do grupo I, amplificando o fragmento bacteriano universal de 370 bp, como também o fragmento espécie-específico de *N. meningitidis*, de 279 bp. Foram calculados os intervalos de confiança em nível de 95% para os dados obtidos no presente estudo (ver anexos) a fim de possibilitar comparações entre as diferentes técnicas. Assim, a positividade de 100% (83,2%-100%) encontrada pela PCR-Multiplex, com o uso de “primers” espécie-específicos, não diferiu significativamente das positivities fornecidas por técnicas de bacterioscopia e LA, ambas de 84,2% (62,4%-94,5%). Todavia, esta reação de amplificação do DNA apresentou positividade superior à de CIE, que foi de 42,1% (23,2%-63,7%), embora esta positividade fosse semelhante às de bacterioscopia e LA (tabela 3).

Nas amostras de LCR de pacientes com alta probabilidade de infecção meningocócica, do grupo II, o agente infeccioso não foi demonstrado por cultura. Contudo, a positividade foi de 100% para a PCR-Multiplex com o uso de “primers” bacterianos universais, e os “primers” espécie-específicos demonstraram que 82,9% (79,4%-94,7%) desta positividade ocorria por conta de *N. meningitidis* e 17,1% por outras bactérias não relacionadas. A bacterioscopia forneceu 100% (94,4%-100%) de positividade, valor este que não difere da PCR-Multiplex. As positivities encontradas para LA e CIE foram significativamente menores, de 27,7% (18,3%-39,6%) e de 13,8% (7,5%-24,3%), respectivamente, que às de PCR-Multiplex e bacterioscopia.

Nas amostras de LCR de pacientes, do grupo III, com provável meningite meningocócica, o fragmento bacteriano universal foi detectado em 89,0%, e nos restantes 11% nenhum fragmento foi amplificado. Foi constatado que em 51,8% (34,0 - 69,3%) das amostras, o fragmento espécie-específico de *N. meningitidis* pôde ser amplificado. As técnicas de cultura, bacterioscopia, LA e CIE foram completamente negativas nestas amostras do grupo III.

As amostras de LCR de pacientes do grupo IV, com infecção causada por outras bactérias não relacionadas a *N. meningitidis*, foram 100% positivas pela reação de amplificação do DNA, usando “primers” universais. Contudo, resultados completamente negativos foram observados com o uso de “primers” espécie-específicos, assim como nas demais técnicas, os resultados foram todos negativos.

No grupo V, as amostras de LCR de pacientes com afecções não bacterianas forneceram resultados negativos para todas as técnicas.

A concordância de resultados positivos e negativos obtidos por técnicas de PCR-Multiplex utilizando “primers” universais, PCR-Multiplex com “primers” espécie-específicos, cultura, bacterioscopia, LA e CIE, no estudo de amostras de LCR de pacientes pertencentes a diferentes grupos, foi investigada. Os resultados obtidos nas amostras de pacientes do grupo I (figura 8) foram positivos por 6 (42,1%), 5 (42,1%) e 3 (15,5%) técnicas. Já no grupo II, os resultados das amostras foram positivos por 5 (13,8%), 4 (16,9%), 3 (58,5%) e 2 (10,8%) técnicas (figura 9). No grupo III, o grau de concordância entre técnicas foi menor, ou seja, resultados foram positivos por 2 (51,9%) técnicas, além dos positivos por apenas uma técnica (37,0%) e três (11,1%) resultados negativos para todas as técnicas (figura 10). A PCR-Multiplex utilizando “primers” universais ou espécie-específicos estavam presentes nos 10 tipos de concordância de técnicas que ocorreram nos grupos I, II e III, enquanto que a bacterioscopia estava presente em 6 tipos, a do LA em 4 tipos, e a CIE somente em 2 tipos.

Nas amostras de LCR de pacientes do grupo IV, os resultados foram totalmente negativos em 5 técnicas. No grupo V, a concordância de resultados negativos foi total por 6 técnicas.

As características diagnósticas da PCR-Multiplex para o diagnóstico da meningite meningocócica foram inicialmente avaliadas, no estudo de amostras de LCR de pacientes com a comprovada infecção por *N. meningitidis*, do grupo I, e de pacientes com afecções não bacterianas, do grupo V. A sensibilidade da PCR-Multiplex (tabela 4) foi de 100% (83,2%-100%), sendo igual à de cultura que foi também de 100%, e não diferindo

também das técnicas de bacterioscopia e LA, ambos com a sensibilidade de 84,2% (62,4%-94,5%). A CIE apresentou sensibilidade menor, de 42,1% (23,2%-63,7%), que à de PCR-Multiplex, porém sendo semelhante às de bacterioscopia e LA. A especificidade encontrada para a PCR-Multiplex foi de 100% (90,6%-100%) que não diferiu das demais técnicas. A eficiência diagnóstica da reação de amplificação do DNA foi também de 100% (93,6%-100%), sendo igual à de cultura, e não diferindo de bacterioscopia e LA, de 94,6% (85,4%-98,2%). Em relação à técnica de CIE que apresentou eficiência diagnóstica de 80,4% (68,2%-88,7%), a PCR-Multiplex foi superior. O valor preditivo de positivo da reação em questão foi de 100% (83,2%-100%) que foi semelhante aos das demais técnicas. O valor preditivo de negativo da PCR-Multiplex foi também de 100% (90,6%-100%) semelhante aos de bacterioscopia e LA, ambos apresentando valores de 92,5% (80,1%-97,4%). A CIE apresentou o valor de preditivo negativo significativamente menor 77,0% (63,5%-86,7%) que as demais técnicas. Desta forma, revelou maior número de resultados negativos falsos, isto é, de 23,0% (13,3%-36,5%).

A PCR-Multiplex foi também avaliada em relação à bacterioscopia, e desta maneira, as características diagnósticas, acima referidas, foram determinadas em grupo de amostras com a bacterioscopia positiva (81) e negativa (87) em pacientes com diagnóstico ou não de meningite meningocócica, como apresentadas na tabela 5. A técnica da PCR-Multiplex demonstrou alta sensibilidade, isto é, de 91,3% (83,2%-95,8%) em relação à bacterioscopia positiva, enquanto que a cultura apresentou sensibilidade significativamente mais baixa, de 19,8% (12,5%-29,7%). Em relação às amostras com bacterioscopia negativa, a reação de amplificação do DNA mostrou sensibilidade de 56,7% (39,3%-72,6%), sendo ainda significativamente mais elevada que à de cultura que foi de 10,0% (3,5%-25,6%). A especificidade da PCR-Multiplex foi de 100% (93,7%-100%), o valor preditivo de positivo, de 100% (81,6%-100%), e o valor preditivo de negativo de 81,4% (70,8%-88,8%), valores estes que não diferiram estatisticamente da cultura.

Foi efetuada uma avaliação geral de todas as técnicas para efeito de comparação da PCR-Multiplex com as técnicas convencionais aqui empregadas, estudando amostras de LCR de 168 pacientes pertencentes a diferentes grupos (tabela 6). A PCR-multiplex revelou sensibilidade maior, de 82,0% (73,8%-88,0%), todavia não diferindo da bacterioscopia, de 73,0% (64,0%-80,4%). A sensibilidade da reação de amplificação do DNA foi significativamente mais elevada que às de cultura que foi de 17,1% (11,2%-25,2%), de LA que foi de 30,6% (22,8%-39,7%) e de CIE, de 15,3% (9,7%-23,2%). A especificidade da PCR-Multiplex foi de 100% (93,7%-100%) e o valor preditivo de positivo também de 100% (96,0%-100%), semelhantes aos valores encontrados para as demais técnicas. Entretanto, o seu valor preditivo de negativo de 74,0% (63,3%-82,5%) não diferiu ao de bacterioscopia que foi de 65,5% (55,1%-74,7%). As técnicas de cultura, LA e CIE mostraram valores preditivos de negativos de 38,3% (30,8%-46,3%), 42,5% (34,5%-51,0%) e 37,7% (30,4%-45,7%), respectivamente. Valores estes que foram significativamente mais baixos que ao de PCR-Multiplex.

Se considerarmos todavia que as amostras de LCR de 7 pacientes do grupo II, tiveram meningite causada por outras bactérias não relacionadas a *N. meningitidis*, os valores de sensibilidade de todas as técnicas tornam-se aumentadas, ou seja, 87,5%, 18,3%, 74,0%, 36,7% e 16,3% para as técnicas de PCR-Multiplex, cultura, bacterioscopia, LA e CIE, respectivamente. Estes valores não diferiram significativamente dos valores anteriores. As especificidades permaneceram estatisticamente iguais, mesmo a bacterioscopia tendo resultados falsos de 10,9%.

Figura 8. RESULTADOS CONCORDANTES ENTRE AS SEIS REAÇÕES ESTUDADAS: PCR-MULTIPLEX UNIVERSAL E ESPECÍFICA, CULTURA, BACTERIOSCOPIA, LA E CIE OBTIDOS NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES COM MENINGITE MENINGOCÓCICA COMPROVADA (GRUPO I)

Figura 9. RESULTADOS CONCORDANTES ENTRE AS SEIS REAÇÕES ESTUDADAS: PCR-MULTIPLEX UNIVERSAL E ESPECÍFICA, CULTURA, BACTERIOSCOPIA, LA E CIE OBTIDOS NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES COM PROVÁVEL MENINGITE MENINGOCÓCICA (GRUPO II)

Figura 10. RESULTADOS CONCORDANTES ENTRE AS SEIS REAÇÕES ESTUDADAS: PCR-MULTIPLEX UNIVERSAL E ESPECÍFICA, CULTURA, BACTERIOSCOPIA, LA E CIE OBTIDOS NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES COM PROVÁVEL INFECÇÃO POR MENINGOCOCO (GRUPO III)

Nº de Reações Concordantes

5. DISCUSSÃO

A PCR-Multiplex foi desenvolvida como novo recurso diagnóstico que associado aos outros métodos já utilizados em rotina laboratorial possa colaborar no diagnóstico, especialmente nos casos em que existe a suspeita clínica da doença, porém não há confirmação do agente etiológico.

No presente estudo, avaliamos a capacidade diagnóstica da PCR que detecta o DNA de *N. meningitidis* no LCR em diferentes grupos de pacientes, com meningite meningocócica apresentando cultura positiva ou negativa, bem como em grupos de pacientes com meningites causadas por bactérias não relacionadas a *N. meningitidis*. Para este propósito resolvemos amplificar parte do fragmento da sequência 16S do rRNA bacteriano. A sequência de nucleotídeos encontrada nesta região, varia de maneira ordenada na árvore filogenética sendo importante no estudo da evolução molecular. Pela mesma razão, esta região é alvo para a síntese de oligonucleotídeos taxonomicamente específicos, alguns dos quais úteis no diagnóstico microbiológico (WOESE, 1987; WILSON et al., 1990).

Este trabalho constituiu-se de duas etapas. A primeira etapa correspondeu à de padronização da técnica da PCR, dada a grande variedade de protocolos existentes na literatura, tanto em relação à extração e preparo do DNA a partir de amostras de LCR ou de cultura bacteriana como na escolha de “primers” adequados para a amplificação do fragmento de DNA. A segunda etapa foi a de verificar o desempenho da técnica estudada no diagnóstico etiológico em comparação aos métodos de cultura e bacterioscopia, considerando-os como sendo de referências. Foram também avaliados outros métodos laboratoriais convencionais que auxiliam o diagnóstico desta infecção, como os testes imunológicos destinados à detecção de antígenos bacterianos: aglutinação de partículas de látex e a contraímunoeletroforese. Provas bioquímicas e citológicas, embora não específicas forneceram apoio ao diagnóstico.

Na etapa de padronização, foram estudadas as condições ótimas para principais fatores inerentes à metodologia, e reagentes da PCR que pudessem influenciar sobremaneira a sensibilidade ou a especificidade do método quando aplicados diretamente em amostras de LCR, conforme mencionados por vários autores (LEONG & GREISEN, 1993; ALTWEGG, 1995; CARRINO & LEE, 1995).

Fatores pertinentes à extração e preparo do DNA, padronização dos reagentes para a determinação da concentração ideal dos reagentes, concentração da DNA polimerase, escolha dos “primers”, ajuste do ciclo térmico para a amplificação do fragmento alvo e a detecção do produto amplificado foram motivo de estudo nesta fase inicial.

Para a obtenção do DNA de *N. meningitidis*, inicialmente, foram testados protocolos utilizando a cultura bacteriana e, posteriormente, aplicado às amostras clínicas. Há vários protocolos de extração, desde os mais simples em que apenas o aquecimento da amostra (95° C/5 min.) é realizado como descrito por NI et al. (1992), até os mais elaborados que se baseiam na propriedade de lise e inativação das nucleases pelo agente tiocianato de guanidina (LEONG & GREISEN, 1993) adicionado de partículas de sílica ou vidro (BOOM et al., 1990).

As amostras de LCR de pacientes com suspeita clínica de meningite meningocócica podem apresentar aspecto límpido, turvo ou purulento principalmente devido à presença de células e bactérias. É importante observar que a probabilidade de se obter a bactéria nas amostras é maior quando esta é concentrada (ISENBERG et al., 1991; KNAPP et al., 1995).

Dessa forma, a metodologia descrita por KERTESZ et al. (1993), constituída de proteinase K (400 ng/μL) com detergentes como Nonidet P-40 (5%) e Tween 20 (5%), foi mais eficiente tanto para cultura bacteriana como para a amostra de LCR suspeita que pode ter em geral celularidade aumentada e conteúdo bacteriano variável, devido ao fato dos diplococos serem intracelulares, na maioria das vezes.

Optamos por não purificar o DNA extraído com fenol-clorofórmio após a lise bacteriana da amostra de LCR, pois o uso deste processo seguido da

precipitação com etanol resultou em uma concentração final de DNA baixa. Fato este comprovado pela quantificação realizada no aparelho GeneQuant que mede a concentração de DNA. Em virtude dos volumes serem muito reduzidos, decidimos por não purificar as amostras.

A concentração do íon magnésio bivalente é primordial na técnica da PCR, pois dependendo da sua concentração, a hibridização é afetada, levando à formação de complexos com dNTPs que diminui a oferta deste íon, necessário na manutenção da atividade enzimática. Seu excesso provoca o acúmulo de produtos indesejáveis com a amplificação de fragmentos inespecíficos (“primer-dimer”). Por outro lado, a deficiência deste íon leva à diminuição do rendimento do produto amplificado ao limite mínimo, provocando em consequência menor sensibilidade, comprometendo a fidelidade da técnica. Portanto, para a determinação da concentração ótima de $MgCl_2$ foi realizada a titulação a partir da concentração de 1,5 mM a 9,0 mM diluindo na razão 0,5 (SAIKI, 1989). Conforme mostrado na figura 5, a concentração ideal foi de 3,0 mM.

O desenho dos “primers” tem influência na especificidade e eficiência da amplificação, principalmente em relação às propriedades que são específicas para cada sistema, tais como: composição de bases (% G+C), comprimento, modificações químicas sofridas e pureza. Em nosso trabalho foram selecionados os “primers” com 19 a 23 nucleotídeos.

Os “primers” utilizados foram testados, verificando-se a especificidade e sensibilidade dos mesmos, no estudo de DNA extraído de cultura de cepa-padrão de *N. meningitidis* (KRISTIANSEN et al., 1991; LEONG & GREISEN, 1993; GREISEN et al., 1994). Inicialmente foram utilizados os “primers” NM1 e NM2 que amplificou o fragmento de 950 bp, descritos por KRISTIANSEN et al. (1991), responsáveis pela seqüência conservada do gene dhps que codifica a enzima dihidropteroato sintetase que faz parte da síntese do ácido fólico. Uma mudança por mutação ou recombinação neste gene confere a resistência à sulfonamida no meningococo.

Em nosso estudo testamos também os “primers” NM1 e NM2 contra o DNA dos principais agentes etiológicos da meningite bacteriana tais como:

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*, assim como de *N. meningitidis*, para a avaliação da sua especificidade. Todos estes agentes apresentaram a amplificação de um fragmento de 950 bp.

Em vista da inespecificidade encontrada com os “primers” NM1 e NM2, passamos a investigar “primers” alternativos tendo como base o fragmento universal bacteriano da região 16S rRNA. A inespecificidade destes “primers” foi também observada por KRISTIANSEN et al. (1995), que contornaram o problema substituindo NM2 por NM6 que amplifica o fragmento bacteriano de 700 bp. Relatam estes autores que a combinação então dos “primers” NM1 e NM6 foi eficiente no estudo da disseminação da doença causada por cepas virulentas em pacientes com a doença meningocócica, bem como em contactantes.

O uso da PCR amplificando o fragmento universal bacteriano tendo como alvo a região conservada do DNA (16S rRNA) foi descrita por BOTTGER (1989) e WILSON et al., (1990).

A sequência 16S rRNA apresenta, aproximadamente 1500 bp contendo regiões conservadas e variáveis que possibilitam gerar oligonucleotídeos complementares a esta sequência que são específicos entre as eubactérias (RELMAN, 1993).

Várias metodologias descrevem a utilização da PCR para a amplificação da sequência universal, 16S rRNA, no diagnóstico da doença meningocócica. LEONG & GREISEN (1993) e GREISEN et al. (1994) utilizaram os “primers” RW01 e DG74 para a detecção do fragmento universal e identificaram o agente etiológico por meio de hibridização com sondas específicas empregando Southern blot. MCLAUGHLIN et al. (1993) amplificaram por PCR um fragmento de 600 bp situado entre as regiões 16S e 23S e identificaram a *N. meningitidis* pela digestão com enzimas de restrição do produto amplificado, gerando o fragmento de 280 bp, específico para o meningococo. RADSTROM et al. (1994), amplificaram a sequência 16S rRNA em duas etapas detectando o meningococo após a segunda etapa por PCR-Seminested. Uma segunda etapa de amplificação pode, de

certa forma, introduzir algum contaminante, como também aumentar o tempo gasto para realização da reação.

Portanto, a estratégia desenvolvida no presente estudo permitiu uma redução do tempo para a detecção e identificação do agente, por ser efetuada em uma única etapa de amplificação.

Com base na sequência 16S rRNA escolhemos os “primers” RW01, DG74 e COR28 descritos por LEONG & GREISEN (1993) e GREISEN et al., (1994) para a realização da PCR-Multiplex. O fragmento universal amplificado pelos “primers” RW01 e DG74 tem 370 bp, e o fragmento específico de *N. meningitidis*, situado dentro da mesma sequência, amplificada pelos “primers” COR28 e DG74, tendo 279 bp.

Estes “primers” apresentaram alta especificidade para *N. meningitidis*, ao contrário dos anteriores quando testados com outros gêneros bacterianos, conforme ilustrado nas figuras 4 e 5.

A técnica da PCR-Multiplex desenvolvida neste trabalho pareceu-nos ser a melhor alternativa para o diagnóstico laboratorial por causa da detecção específica de *N. meningitidis*, além de ser uma técnica rápida e simples sem o uso de sondas radioativas ou a digestão com enzimas de restrição.

Para a otimização da PCR foi importante assegurar o equilíbrio térmico do tampão, pois o ajuste do perfil térmico variou de acordo com o volume empregado na reação. A temperatura da etapa inicial de desnaturação costuma ser crítica, devendo garantir a completa separação da fita dupla do DNA “template”. No protocolo inicial descrito por LEONG & GREISEN (1993) e GREISEN et al. (1994) foi proposto na técnica da PCR o “hot start”, etapa de desnaturação inicial em que é realizado o aquecimento a 95° C por 5 minutos, e 25 ciclos, sendo cada ciclo de 25 segundos a 95° C e 55° C. Para a PCR-Multiplex as temperaturas foram ajustadas, acrescentando-se mais uma etapa para garantir a extensão. Após o “hot start”, o aparelho foi então programado para 30 ciclos: 94° C/1 min.; 56° C/1 min. e 72° C/ 1 min., um ciclo de 10 min. a 72° C e mantidos a 4° C até o preparo da amostra pós-PCR para a visualização em gel de agarose.

Concluída a fase de padronização onde as condições ótimas da PCR-Multiplex foram selecionadas, teve início a fase de avaliação desta técnica.

Os dados gerais mostram que a PCR-Multiplex apresenta alta positividade, seguida da bacterioscopia, LA, CIE e cultura (tabela 3). Esta reação foi a que apresentou maior grau de concordância com as demais técnicas (figuras 8, 9 e 10), seguida da bacterioscopia.

A avaliação da técnica de PCR-Multiplex foi realizada adotando-se três abordagens diferentes a fim de apreciar melhor o seu desempenho diagnóstico. Na primeira abordagem, as características diagnósticas desta reação foram relacionadas com a cultura, estudando-se amostras de LCR de pacientes com meningite meningocócica e pacientes sem infecção bacteriana, mas com outras infecções. Na segunda abordagem, a reação de amplificação do DNA foi comparada com a bacterioscopia, que é a técnica até hoje utilizada na rotina diagnóstica por ser simples, prática, econômica, fornecendo resultados em curto prazo de tempo, embora não permita a identificação bacteriana. Para tanto, amostras obtidas de 168 pacientes foram estudadas. Na terceira abordagem, a reação foi relacionada com os dados gerais de diagnóstico clínico em conjunto com os laboratoriais, nas mesmas amostras de 168 pacientes.

Na primeira abordagem da avaliação, o desempenho diagnóstico da PCR-Multiplex em relação à cultura foi excelente, sendo de 100%, assim como a sua especificidade, que também foi de 100%. Este tipo de avaliação em amostras de pacientes com o diagnóstico bem definido é essencial, pois fornece-nos a informação *a priori* quanto ao seu comportamento, possibilitando prever a probabilidade do seu sucesso *a posteriori*, em avaliações interlaboratoriais, quando será submetida a um número considerável de amostras. Os dados reportados na literatura sobre técnicas de amplificação do DNA para o diagnóstico da meningite meningocócica são ainda escassos, mesmo em se tratando de técnicas de DNA baseadas em princípios diferentes à do presente estudo. Desta forma, para podermos comparar os nossos achados com os de outros investigadores, calculamos

as sensibilidades e especificidades, bem como os respectivos intervalos de confiança.

A sensibilidade da PCR-Multiplex foi estatisticamente semelhante às sensibilidades de 90,9% (NI et al., 1992) e 100% (NEWCOMBE et al., 1996) encontradas para a PCR empregando a amplificação do gene alvo IS1106. Da mesma forma, as sensibilidades relatadas variando desde 100% a 81,0% para as técnicas empregando o gene 16S rRNA (RADSTROM et al., 1994), o gene *porA* (KERTESZ et al., 1993; CAUGANT et al., 1996; SAUNDERS et al., 1997), assim como o gene *siaD* (BORROW et al., 1997), não diferem estatisticamente da sensibilidade da PCR-Multiplex. A especificidade da PCR-Multiplex foi também semelhante às reportadas para a PCR amplificando a seqüência de inserção IS1106 (NI et al., 1992), para o gene 16S rRNA (RADSTROM et al., 1994), assim como para o gene *porA* (KERTESZ et al., 1993; SAUNDERS et al., 1997). Nos demais trabalhos, os autores não reportaram sobre o diagnóstico dos pacientes, o que dificultou a determinação das suas especificidades.

Na segunda abordagem de avaliação, a sensibilidade da PCR-Multiplex foi de 91,3% em relação à bacterioscopia positiva, dado este que não diferiu estatisticamente do valor de 100% da metodologia tomada como referência. Todavia ocorreram resultados aparentemente discrepantes em 7 amostras de pacientes com alta probabilidade de meningite meningocócica, do grupo II, nas quais foram observadas a presença de diplococos Gram-negativos e resultados negativos por PCR-Multiplex. Desde que nestas amostras a amplificação do fragmento universal havia sido observada, a explicação seria a de que a meningite não foi causada por *N. meningitidis*. Durante surtos epidêmicos, a bacterioscopia é o método que fornece melhores resultados quando comparado com a cultura, contudo, no diagnóstico individual da infecção não se pode levar em consideração apenas estes dois métodos. Pois, o tratamento antimicrobiano prévio poderá alterar seus resultados, apresentando distorção morfológica, levando a uma falsa interpretação de diplococos, como referido por alguns autores (VADHER et al., 1991; OLCÉN et al., 1995). Assim, àquelas 7 amostras

acima referidas poderiam ser bactérias outras não relacionadas com *N. meningitidis*. A sensibilidade de 56,7% da PCR-Multiplex foi significativa no estudo de amostras de LCR com bacterioscopia negativa. Diplococos Gram-negativos não foram encontrados em 87 amostras de LCR, nos quais se incluíam 30 amostras de pacientes com diagnóstico de meningite meningocócica. Três amostras pertenciam aos pacientes do grupo I e 27 amostras aos pacientes do grupo III. Neste grupo de pacientes a bacterioscopia foi negativa, porém a PCR-Multiplex apresentou positividade de 51,8% (34,0%-69,3%), aproximando-se dos achados no estudo de grupos semelhantes de pacientes referidos na literatura, de 53,6% (35,8%-70,4%) com a PCR tendo IS1106 como alvo (NEWCOMBE et al., 1996), e de 71,4% (50,0%-86,2%) com a PCR utilizando o gene porA (CAUGANT et al., 1996). Este grupo III consistia de 27 pacientes e em 24 destes tiveram suas amostras amplificadas por “primers” universais, dos quais 14 identificadas como tendo material genômico de *N. meningitidis*. Portanto 3 amostras ficaram com resultados completamente negativos por qualquer uma das técnicas estudadas. Tal negatividade pode ser atribuída à possível degradação do DNA, ou então à manifestação da meningite teria origem não bacteriana. Quanto a possibilidade de interferência de inibidores de enzimas, se presentes nas amostras, foi descartada com a contraprova realizada no item 4.3 de Materiais e Métodos. Fator outro relevante, que poderia influenciar dando resultados negativos, seria a concentração bacteriana no fluído biológico insuficiente para a extração do material genômico. Considerando-se que a bacterioscopia foi negativa nessas amostras, pressupõe-se que a concentração era inferior a 1×10^3 UFC/mL concentração esta referida como sendo mínima para fornecer resultado positivo por bacterioscopia (ISENBERG et al., 1991). Contudo para se obter positividade alta de 97,0% requer concentrações acima de 10^5 UFC/mL (SCOLEA & DRYA, 1984). Ademais, se a PCR-Multiplex foi negativa, a concentração bacteriana seria inferior a 1×10^2 UFC/mL concentração esta que determinamos no presente estudo como sendo mínima necessária para apresentar resultados reprodutíveis (figura 6).

Em muitas situações clínicas é imperativa a prática da antibioticoterapia imediata dada a gravidade da doença, o que acarreta prejuízo à cultura e à bacterioscopia, contribuindo para resultados negativos falsos. Neste contexto, a PCR-Multiplex poderá prestar auxílio inestimável no diagnóstico da meningite meningocócica, uma vez que estas técnicas convencionais são pouco sensíveis.

A especificidade da PCR-Multiplex foi sempre máxima, da mesma forma que reportadas para outras técnicas de PCR acima referidas, porém se faz necessário que a técnica aqui padronizada seja confirmada em avaliações interlaboratoriais com número significativamente maior de amostras, a fim de excluirmos a possibilidade da existência de resultados falsos positivos. A ocorrência de resultados positivos falsos por conta da contaminação parece-nos remota, pois a técnica aqui padronizada contorna este problema, realizando as amplificações do DNA em uma única etapa. Além disso, não observamos nenhuma amplificação do fragmento específico de 279 bp, na ausência da amplificação do fragmento universal de 370 bp. Os achados das amostras de pacientes dos grupos IV e V parece-nos suficientes para sustentar a alta especificidade da reação de amplificação do DNA.

Na terceira abordagem da avaliação a sensibilidade geral da PCR-Multiplex foi comparável à de bacterioscopia, assim como a especificidade, mesmo quando se procedeu a reconsideração da interpretação daqueles 7 pacientes, como sendo meningite bacteriana, mas não a meningite meningocócica. Desta forma, estes achados evidenciam a utilidade de reação de amplificação do DNA em pacientes com diagnóstico clínico de meningite meningocócica, mas com bacterioscopia negativa.

No presente estudo, incluímos as técnicas imunológicas de detecção de antígenos de *N. meningitidis*, a par de técnicas de cultura e bacterioscopia, em virtude das técnicas de LA e de CIE fornecerem resultados em curto prazo de tempo. Assim, vem sendo empregado como técnicas auxiliares no diagnóstico desta infecção, notadamente em pacientes que já iniciaram o tratamento antimicrobiano, quando os resultados são em

geral negativos por técnicas bacteriológicas. A técnica de LA apresenta alta sensibilidade quando a concentração bacteriana encontra-se $> 10^3$ a 10^4 UFC/mL (OLCÉN et al., 1995). Portanto, é possível inferirmos que a maioria das amostras de LCR dos pacientes do grupo I apresentava concentração bacteriana próxima destes valores, pois a sua positividade foi comparável à de bacterioscopia e da PCR-Multiplex. Nas amostras do grupo II, a maioria estava provavelmente em concentração menor do que estes valores, razão pela qual a positividade tornou-se consideravelmente mais baixa que à de bacterioscopia, e no grupo III, a concentração bacteriana estaria em nível mais reduzido ainda, fornecendo resultados completamente negativos, à semelhança da bacterioscopia.

Assim a sensibilidade e a especificidade encontrada no grupo I por LA aproximam-se dos dados encontrados por ENDE et al. (1995) em estudo comparativo de três técnicas de LA comerciais destinados ao diagnóstico da meningite meningocócica causada principalmente pelos sorogrupos A, B e C. A CIE por sua vez apresentou uma sensibilidade superior (42,1%) neste grupo I ao relatadas na literatura (BURANS et al., 1989) de 27%.

É preciso salientar que os métodos imunológicos foram utilizados segundo a recomendação do fabricante ou das NORMAS TÉCNICAS PARA O DIAGNÓSTICO DAS MENINGITES BACTERIANAS (1986) nas amostras de LCR não concentradas diferindo dos métodos de bacterioscopia e PCR-Multiplex. Desta forma, podemos explicar as baixas sensibilidades encontradas na avaliação geral por estas técnicas imunológicas.

No presente trabalho, os objetivos propostos foram plenamente alcançados.

6. CONCLUSÕES

- A técnica da PCR-Multiplex foi padronizada para ser aplicada no diagnóstico da meningite meningocócica, assim como, para a detecção de outros agentes bacterianos, em uma única etapa o que evitou a possibilidade de eventuais contaminações. Esta técnica fornece resultados em curto prazo de tempo (5 a 6 horas) mesmo nos casos em que a antibioticoterapia já tenha sido iniciada.

- A avaliação da técnica da PCR-multiplex, realizada no estudo de pacientes com meningite meningocócica comprovada, demonstrou resultados altamente sensíveis (100%) e específicos (100%).

- A PCR-Multiplex apresentou 91,3% da sensibilidade e 100% de especificidade em relação à bacterioscopia. Todavia, a avaliação geral efetuada em relação ao diagnóstico clínico e laboratorial, a sua sensibilidade foi de 82,0% e a especificidade de 100%.

- A PCR-Multiplex é uma técnica bastante sensível que permite detectar simultaneamente a *N. meningitidis* e outras bactérias causadoras de meningite, fornecendo melhor subsídio à clínica. No entanto, a sua utilização na rotina laboratorial poderia ser bastante útil em casos de bacterioscopia negativa. Os dados obtidos nesta avaliação inicial deverão ser confirmados e validados por outros laboratórios de Saúde Pública antes de serem introduzidos em rotina diagnóstica.

7. RESUMO

A meningite causada por *Neisseria meningitidis* ainda é um dos principais problemas de saúde pública no Brasil. Somente na Grande São Paulo no ano de 1997 ocorreram 1172 casos de meningite meningocócica, representando um coeficiente de incidência de 7,18 casos/100.000 habitantes com 14,9% de letalidade. A gravidade da enfermidade devido a sua letalidade e alto grau de seqüelas neurológicas justifica uma especial atenção para um diagnóstico laboratorial rápido, particularmente em pacientes submetidos à antibioticoterapia prévia onde o resultado da cultura é negativo.

Para tanto realizamos a padronização de um método de amplificação denominado de PCR-Multiplex. Nesta fase foram estudadas as condições ótimas de concentração dos reagentes, tais como: dNTPs, “primers”, cloreto de magnésio e polimerase, além da extração do DNA utilizando cepas-padrão e do ajuste do ciclo térmico para a amplificação dos fragmentos. Os “primers”: RW01, DG74 e COR28, utilizados na reação de amplificação, baseados na subunidade menor do ribossomo (16S rRNA), amplificam o fragmento bacteriano universal de 370 bp (RW01 e DG74) e o fragmento específico de *N. meningitidis* de 279 bp (RW01 e COR28). A especificidade e a sensibilidade dos “primers” empregados foram determinados nesta fase de padronização.

Para a avaliação da eficiência diagnóstica do teste padronizado foram estudadas 168 amostras de LCR de pacientes que apresentavam ou não suspeita de meningite meningocócica. O índice diagnóstico da técnica padronizada verificada pela sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo de 91,3%, 100%, 100% e 74,0%, respectivamente, quando comparados ao método de cultura que apresentou sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo de 19,7%, 100%, 100% e 14,7%, respectivamente. Estes dados sugerem que a técnica padronizada pode ser utilizada como método diagnóstico da meningite meningocócica, especialmente nos casos de pacientes que foram

submetidos à terapia antibiótica prévia, bem como de pacientes que apresentam microscopia negativa.

Esta técnica permite detectar não só o DNA de *N. meningitidis* como também, DNA de outras bactérias em uma única etapa de amplificação, além de reduzir o tempo de detecção e identificação do agente causador da meningite. A aplicação desta metodologia em rotina laboratorial é possível, assim como os outros testes já existentes.

8. ABSTRACT

The meningitis caused by *Neisseria meningitidis* remains a public health problem in Brazil. In the Greater São Paulo during 1997 the occurrence was 1172 cases of meningococcal meningitis representing an incidence of 7.18 cases/100.000 inhabitant with 14.9% lethality. The severity and high incidence of this disease justifies special attention for a rapid laboratory diagnostic test, for use before the antibiotic-therapy.

The optimization of the Multiplex-PCR, we make for determining the reagents concentration: dNTPs, primer's, magnesium chloride and Taq-polymerase. DNAs of the reference strains were used to adjust the thermal cycle conditions for amplification. The primers: RW01 and DG74, were used to identify the bacterial universal fragment 16S rRNA gene (370 bp). RW01 and COR28 primers were used to identify the segment specific for *N. meningitidis* (279 bp).

For the diagnostic evaluation of this method, we studied 168 CSF samples from patients with clinical symptoms of the meningococcal meningitis infection or other infections. The diagnostic values for this method were checked for sensitivity, specificity, positive and negative predictive values. The results were; 91.3%, 100%, 100% and 74.0% respectively. This results were compared with the culture it was presented; sensitivity (19.7%), specificity (100%), positive and negative predictive values (100%, 14.7%, respectively). The results suggest that method could be used for the diagnostic to meningococcal meningitis, even after the antibiotic-therapy starting in patients with negative microscopy analyses.

The convenience and short preparatory time of this method makes it a useful alternative to detect *N. meningitidis*.

This methodology may be useful test in routine laboratories after validation.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOUA-KOFFI, F., FAYE-KETTE-ACHI, H., SYLLA-KOKO, F., KACOUNDOUBA, A., ACHO, Y. B., AVOAKA-CISSE, L., BOUZID, S. A., KOUASSI, A. A., DOSSO, M. The contribution of latex tests for the diagnosis of bacterial infections in Abidjan. **Bull. Soc. Pathol. Exot. ses. Fil.**, Paris, v. 87, p. 77-80, 1984.

ALKMIN, M. G. A. **Neisseria meningitidis grupo B**: padronização e avaliação da técnica imunoenzimática, MB-Dot-ELISA, e caracterização do anti-soro empregado para a detecção de antígenos no líquido cefalorraquidiano. São Paulo, 1992. 105p. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

ALKMIN, M. G. A., LANDGRAF, I. M., SHIMIZU, S. H. Detection of *N. meningitidis* group B antigens by MB-Dot-ELISA in patients with meningitis. **Bull. Pan Am. Health Org.**, Washington, v. 30, p. 212-217, 1996.

ALTWEGG, M. General problems associated with diagnostic applications of amplification methods. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v. 23, p. 21-30, 1995.

BALLARD, T. L., ROE, H., WHEELER, R. C., TODD, J. K., GLODE, M. P. Comparison of three latex agglutination kits and counterimmunoelectrophoresis for the detection of bacterial antigens in a pediatric population. **Pediatr. Infect. Dis.**, Baltimore, v. 6, p. 630-634, 1987.

*De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1996.

BERLOW, S. J., CALDARELL, D. D., MATZ, G. D. Bacterial meningitis and sensorineural hearing loss: a prospective investigation. **Laryngoscope**, St. Louis, v.90, p.1445-1452, 1980.

BEUVERY, E. C., VAN ROSSUM, F., LAUWERS, S., COIGNAW, H. Comparison of counterimmunoelectrophoresis and ELISA for diagnosis of bacterial meningitis. **Lancet**, London, v.1, p.208, 1979.

BOOM, R., SOL, C. J. A., SALIMANS, M. M. M., JANSEN, C. L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E., NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.28, p.495-503, 1990.

BORROW, R., CLAUS, H., GUIVER, M., SMART, L., JONES, D. M., KACZMARSKI, E. B., FRASCH, M., FOX, A. J. Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialyltransferase (siaD) PCR ELISA. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 118, p. 111-117, 1997.

BOTTGER, E. C. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 65, p. 171-176, 1989.

BOVRE, K. HOLTEN, E., VIK-MO, H., BRONDBO, A., BRATLID, D., BJARK, P., MOE, P. J. Neisseria meningitidis infection in northern Norway: an epidemic in 1974-1975 due mainly to group B organisms. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.4, p.669-672, 1977.

BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. **Normas técnicas para o diagnóstico das meningites bacterianas**. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1986. 49p. [Série A: Normas e Manuais Técnicos, n. 32]

- BROTE DE MENINGITIS MENINGOCÓCICA EN CHILE. **Bol. Epidemiol.**, v.14, n.3, p.10, 1993.
- BURANS, J. P., TAYEB, M., ABU-ELYAZEED, R., WOODY, J. N. **Lancet**, London, p.158-159, 1989.
- CAMARGOS, P. A. M., ALMEIDA, M. S., FILHO, G. L., BATISTA, K. W. R., CARVALHO, A. G., PEREIRA, C. L. blood stained cerebrospinal fluid responsible for false positive reactions of latex particle agglutination tests. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 47, p. 1116-1117, 1994.
- CARRINO, J. J., LEE, H. H. Nucleic acid amplification methods. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v. 23, p. 3-20, 1995.
- CARTWRIGHT, K. A. V., STUART, J. M., NOAH, N. D. An outbreak of meningococcal disease in Gloucestershire. **Lancet**, London, v.2, p.558-561, 1986.
- CAUGANT, D. A., ARNE HOIBY, E., ODDVAR FROHOLM, L., BRANDTZAEG, P. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v. 28, p. 149-153, 1996.
- CAUGANT, D. A., MOCCA, L. F., FRASCH, C. E., FROHOLM, L. O., ZOLLINGER, W. D., SELANDER, R. K. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype and, outer membrane protein pattern. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v.169, p.2781-2792, 1987.
- DENIS, F., PRINCE-DAVID, M., SAULNIER, M., TERROT, C., CADOZ, M., CHIRON, J. P., DIOPMAR, I. Test d'agglutination avec latex et contre-immunoélectrophorèse dans le diagnostic des méningites à *Haemophilus influenzae*. **Pathol. Biol.**, Paris, v.31, p.97-101, 1983.

DIAZ ROMERO, J., OUTSCHOORN, I. M. Current status of meningococcal group B vaccine candidates: capsular or noncapsular? **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.7, p.559-575, 1994.

DOENÇA MENINGOCÓCICA NO BRASIL: avaliação do primeiro semestre de 1988. **Bol. Nac. Epidemiol.**, Brasília, v.1, n.8, 1988. [fotocópia não paginada].

ENDE, A., SCHUURMAN, I. G. A., HOPMAN, C. T. P., FIJEN, C. A. P., DANKERT, J. J. **Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, p.3326-3327, 1995.

FACKLAM, R. R., WASHINGTON, J. A. Streptococcus and related catalase-negative gram-positive cocci. In: BALOWS, A., HAUSLER Jr., W. J., HERRMANN, K.L., ISENBERG, H. D., SHADOMY, H. J., eds. **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. p.238-257.

FARHAT, C. K. Meningites bacterianas (MB). In: FARHAT, C. K., ed. **Cadernos de terapêutica pediatria**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1992. p.41-47.

FARHAT, C. K. Meningites bacterianas purulentas. In: FARHAT, C. K., CARVALHO, E. S., CARVALHO, L. H. F. R., SUCCI, R. C. M., eds. **Infecções e parasitoses em pediatria**. São Paulo: Harbra, 1988. p.113-132.

FRASCH, C. E. Development of meningococcal serotyping. In: VEDROS, N. A., ed. **Evolution of meningococcal disease**. Boca Raton: CRC Press, 1987. v.2, p.40-54.

GALEN, R. S., GAMBINO, S. R. **Beyond normality**: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. New York: Wiley, 1975. 237p.

GOMES, M.C.O. Como diagnosticar e tratar meningite. **RBM Rev. Bras. Med.**, São Paulo, v.48, p.9-27,1991.

GRAY, L. D., FEDORKO, D. P. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.5, p.130-145, 1992.

GREISEN, K., LOEFFELHOLZ, M., PUROHIT, A., LEONG, D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, p.335-351, 1994.

HAIMANOT, R. T., CAUGANT, D. A., FEKADU, D., JUNE, G. Characteristics of serogroup A *Neisseria meningitidis* responsible for an epidemic in Ethiopia, 1985-1989. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v. 22, p. 171-174, 1990.

HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T. Gram-negative aerobic/microaerophilic rods and cocci. In: HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T., eds. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 71-174.

ISENBERG, H. D., WASHINGTON, J. A., DOERN, G. V., AMSTERDAM, D. Specimen collection and handling. In: BALOWS, A., HAUSLER Jr., W. J., HERRMANN, K. L., ISENBERG, H. D., SHADOMY, H. J., eds. **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. p.15-28.

IVERSEN, B. G., AAVITSLAND, P. Meningococcal disease in Norway 1992-1995. Epidemiology and fatality. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v.28, p.253-259, 1996.

JONES, D. M. Current and future trends in immunization against meningitis. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.31, suppl. B, p.93-99, 1993.

JONES, D. M. Epidemiology of meningococcal infection in England and Wales. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v.26, p.165-168, 1988.

KALDOR, J., ASZNOWILZ, R., BUIST, D. G. P. Latex agglutination in diagnosis of bacterial infections, with special reference to patients with meningitis and septicemia. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.68, p.284-289, 1977.

KARCH, H., SCHWARZKOPF, A., SCHMIDT, H. Amplification methods in diagnostic bacteriology (selected samples). **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v.23, p.55-73, 1995.

KERTESZ, D. A., BYERNE, S. K., CHOW, A. W. Characterization of *Neisseria meningitidis* by polimerase chain reaction and restriction endonuclease digestion of the porA gene. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, p.2594-2598, 1993.

KILPI, T., ANTTIBA, M., MARKKU, J. T., MUKKI, P. Lenght of prediagnostic history related to the course and sequele of childhoad bacterial meningitis. **Pediatr. Infect. Dis.**, Baltimore, v.12, p.184-188, 1993.

KLEIMAN, M. B., REYNOLDS, J. K., WATS, N. H., SCHREINER, R. L., SMITH, J. W. Superiority of acridine orange stain versus Gram stain in partially treated bacterial meningitis. **J. Pediatr.**, St. Louis, v.104, p.401-404, 1984.

KNAPP, J. S., RICE, R. J. *Neisseria* and *Branhamella*. In: MURRAY, P. R., BARON, E. J., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C., YOLKEN, R. H., eds. **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1995. p.324-340.

KRISTIANSEN, B. E., ASK, E., JENKINS, A., FERMER, C., RADSTROM, P., SKÖLD, O. Rapid diagnosis of meningococcal meningitis by polimerase chain reaction. **Lancet**, London, v.337, p.1568-1569, 1991.

KRISTIANSEN, B. E., FERMÉR, C., JENKINS, A., ASK, E., SWEDBERG, G., SKÖLD, O. PCR amplicon restriction endonuclease analysis of the chromossomal *dhps* gene of *Neisseria meningitidis*: a method for studying spread of the disease causing strain in contacts of patients with meningococcal disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, p.1174-1179, 1995.

LAUER, B. A., RELLER, L. B., MIRRETT, S. Comparison of acridine orange and gram stains for detection of microorganisms in cerebro spinal fluid and other clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 14, p. 201-205, 1981.

LEONG, D. U., GREISEN, K. S. Detection of bacteria found in cerebrospinal fluid. In: PERSING, D. H., SMITH, T. F., TENOVER, F. C., WHITE, T. J., eds. **Diagnostic molecular microbiology principles and applications**. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p.300-306.

LONGO, J.C. Meningites bacterianas. In: PRADO, F. C., RAMOS, J., VALLE, J. R. **Atualização terapêutica**. 14. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1988. p.10-16.

MAJOR, R. H. Infectious diseases. In: MAJOR, R. H., ed. **Classic description of disease**. 3. ed. Springfield: C. C. Thomas, 1945. p. 189-191.

MASTRANTONIO, P., CONGIU, M. E. SELANDER, R. K., CAUGANT, D. A. Genetic relationships among strains of *Neisseria meningitidis* causing disease in Italy, 1984-1987. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.106, p.143-150, 1991.

MCGEE, Z. A., BARINGER, J. R. Acute meningitis. In: MANDELL, G. L., DOUGLAS, R. G., BENNETT, J. E., eds. **Principles and practice of infectious diseases**. 3. ed. New York: Medical, 1990. p.741-755.

MCLAUGHLIN, G. L., HOWE, D. K., BIGGS, D. R., SMITH, A. R., LUDWINSKI, P., FOX, B. C., TRIPATHY, D. N., FRASCH, C. E., WENGER, J. D., CAREY, R. B. Amplification of rDNA loci to detect and type *Neisseria meningitidis* and other eubacteria. **Mol. Cell Probes**, v. 7, p. 7-17, 1993.

MELLES, C. E. A., LEE, I. M. L., TAUNAY, A. E. Pesquisa de antimicrobianos no líquido cefalorraquidiano. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.44, p.155-159, 1984.

MENINGITE MENINGOCÓCICA. **Bol. Epidemiol.**, Brasília, v.11, n.1, p. 1-3, 1990.

MULLIS, K. B., FALOONA, F. A., Specific synthesis of DNA *in-vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.**, New York, v.15, p.335-350, 1987.

MURRAY, P. R. *Neisseria*. In: MURRAY, P. R., KOBAYASHI, G. S., PFALLER, M. A., ROSENTHAL, K. S., eds. **Medical microbiology**. 2. ed. London: Wolfe International, 1994. p.215-226.

NEWCOMBE, J., CARTWRIGHT, K., PALMER, W., McFADDEN, J. PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 34, p.1637-1640, 1996.

NI, H., KNIGHT, A. I., CARTWRIGHT, K., PALMER, W. H., McFADDEN, J. Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. **Lancet**, London, v.340, p.1432-1434, 1992.

OLCÉN, P., LANTZ, P. G., BÄCKMAN, A., RADSTRÖM, P. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by a seminested PCR strategy. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v.27, p.537-539, 1995.

PIERRE, C., LECOSSIER, D., BOUSSOUGANT, D., BOCART, D., JOLY, V., YENI, P., HANCE, A. J. Use of a reamplification protocol improves the sensitivity of detection of mycobacterium tuberculosis in clinical samples by amplification of DNA. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 29, p. 712-717, 1991.

RADSTROM, P., BACKMAN, A., QIAN, N., KRAGSBJERG, P., PAHLSON, C., OLCÉN, 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.**, Washington, v.32, p.2738-3744, 1994.

RELMAN, D. A. Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. In: PERSING, D. H., SMITH, T. F., TENOVER, F. C., WHITE, T. J., eds. **Diagnostic molecular microbiology principles and applications**. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p.489-495.

ROTHMAN, K. J., BOICE, J. D. **Epidemiologic analysis with programmable calculator**. Boston: Epidemiology resources, 1982. P. 24-32.

SACCHI, C.T., TONDELLA, M. L. C., LEMOS, A. P. S., GORLA, M. C. O., BERTO, D. B., KUMIOCHI, N. H., MELLES, C. E. A. Characterization of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup C strains in several brazilian states. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, p.1783-1787, 1994.

SAEZ-LLORENS, X., McCracken, G. H. Bacterial meningitis in neonates and children. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, Washington, v.4, p.623-643, 1990.

SAEZ-LLORENS, X., McCracken, G. H. Mediators of meningitis: therapeutic implications. **Hosp. Pract.**, New York, v.26, p.68-77, 1991.

SAIKI, R. K., GELFAND, D., STOFFEL, S. Primer-directed amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v.239, p.487-491, 1988.

SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, p. 1350-1354, 1985.

SALIH, M. A., DANIELSON, D., BACKMAN, A., CAUGANT, D. A., ACHTMAN, M., OLCEN, P. Characterization of epidemic and nonepidemic *Neisseria meningitidis* serogroup A strains from Sudam and Sweden. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.28, p.1711-1719, 1990.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Base de Dados**: estatística, 1970-1995.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Instituto de Infectologia Emílio Ribas. **Base de Dados:** estatística, 1988-1997.

SAUNDERS, N. B., SHOEMAKER, D. R., BRANDT, B. L., ZOLLINGER, W. D. Confirmation of suspicious cases of meningococcal meningitis by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, p. 3215-3219, 1997.

SAUNDERS, N. B., ZOLLINGER, W. D., RAO, V. B. A rapid and sensitive PCR strategy employed for amplification and sequencing of *porA* from a single colony-forming unit of *Neisseria meningitidis*. **Gene**, Amsterdam, v. 137, p. 153-162, 1993.

SCHLECH III, W. F. The epidemiology of bacterial meningitis. In: SCHÖNFELD, H., HELWIG, H., eds. **Bacterial meningitis**. Basel: Karger, 1992. p.1-29. [Antibiotics and Chemotherapy, 45].

SCHOOLNIK, G. K. PCR detection of *Shigella* species and enteroinvasive *Escherichia coli*. In: PERSING, D. H., SMITH, T. F., TENOVER, F. C., WHITE, T. J., EDS. **Diagnostic molecular microbiology principles and applications**. Washington: American Society for Microbiology, 1980. P. 277-281.

SCOLEA, L. J., DRYJA, D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.19, p.187-190, 1984.

STEPHENS, D. S., HOFFMAN, L. H., MCGEE, Z. A. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.148, p.369-376, 1983.

- STEPHENS, D. S., MCGEE, Z. A. Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surface: influence of pili and type of receptor cell. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.143, p.525-532, 1981.
- STROFFOLINI, T., CONGIU, M. E., OCCHIONERO, M., MASTRANTONIO, P. Meningococcal disease in Italy. **J. Infect.**, London, v.16, p.69-74, 1989.
- STUART, J. M., CARTWRIGHT, K. A. V., JONES D. M. An outbreak of meningococcal disease in Stonehouse: planning and execution of a large scale survey. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.99, p.579-589, 1987.
- SURI, M., KABRA, M., SINGH, S., RATTAN, A., VERMA, I. C. Group B meningococcal meningitis in India. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v.26, p.771-773, 1994.
- SWAMINATHAN, B., MATAR, G. M., REEVES, M. W., GRAVES, L. M., AJELLO, G., BIBB, W. F., HELSEL, L. O., MORALES, M., DRONAVALLI, H., EL-SWIFFY, M., DEWITT, W., HUNTER, S. B. Molecular subtyping of *Neisseria meningitidis* serogroup B: comparison of five methods. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 34, p. 1468-1473, 1996.
- TUNKEL, A. R., WISPELWEY, B., SCHELD, W. M. Pathogenesis and pathophysiology of meningitis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, Washington, v. 4, p.455-481, 1990.
- VADHER, P. J., VAIDYA, N. S., SONI, P., KALE, V. V. Bacteriological study of meningococcal meningitis. **J. Post. Med.**, v. 37, p. 76-78, 1991.
- VERHEUL, A. F. M., SNIPPE, H., POOLMAN, J. T. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.57, p.34-49, 1993.

- WEICHSELBAUM, A. Veber die aetiologie der akuten meningitis cerebrospinalis. **Fortschr. Med.**, Munich, v.5, p.573-583, 1887.
- WENGER, J. D., HIGHTOWER, A. W., FACKLAM, R. R., GAVENTA, S., BROOME, C. V. (Bacterial Meningitis Study Group). Bacterial meningitis in the United States. Report of a multistate surveillance study. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.162, p.1316-1323, 1990.
- WILSON, K. H., BLITCHINGTON, R. B., GREENE, R. C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.28, p.1942-1946, 1990.
- WISPELWEY, B., TUNKEL, A. R., SCHELD, W. M. Bacterial meningitis in adults. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, Washington, v.4, p.645-659, 1990.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.51, p.221-271, 1987.
- ZHANG, Q. Y., JONES, D. M., SÁEZ NIETO, J. A., TRALLERO, E. P., SPRATT, B. G. Genetic diversity of penicillin-binding protein 2 genes of penicillin-resistance of *N. meningitidis* revealed by fingerprinting of amplified DNA. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.34, p.1523-1528, 1990.
- ZOLLINGER, W. D. New and improvement against meningococcal disease. In: WOODROW, G. C., LEVINE, M. M., eds. **New generation vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1990. p.325-347.

10. ANEXOS

AMOSTRAS DO GRUPO I

Nº	AMOSTRAS	GRAM	LATEX	CIE	CULTURA	PCR-Multiplex Universal N.m.	
1	1	DGN	B	B	B	+	+
2	2	DGN	B	B	B	+	+
3	5	DGN	B	NEGATIVA	B	+	+
4	6	DGN	B	B	B	+	+
5	20	DGN	C	C	C	+	+
6	27	DGN	B	NEGATIVA	B	+	+
7	30	DGN	C	NEGATIVA	C	+	+
8	47	DGN	C	NEGATIVA	C	+	+
9	55	NOB	NR	NEGATIVA	B	+	+
10	59	DGN	C	C	C	+	+
11	65	DGN	C	C	C	+	+
12	78	DGN	B	B	B	+	+
13	131	NOB	NR	NEGATIVA	B	+	+
14	150	DGN	B	NEGATIVA	B	+	+
15	162	DGN	B	NEGATIVA	B	+	+
16	163	DGN	C	C	C	+	+
17	165	DGN	B	NEGATIVA	B	+	+
18	182	NOB	NR	NEGATIVA	B	+	+
19	201	DGN	B	NEGATIVA	B	+	+
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							

LEGENDA: GRAM: coloração de Gram

DGN: diplococo Gram-negativo

NOB: não se observou bactérias

CIE: contra-imunoelektroforese

PCR: reação em cadeia da polimerase

B e C: sorogrupos B e C

NR: não reagente

+: amplificação de fragmento

AMOSTRAS DO GRUPO II

Nº	AMOSTRA	GRAM	LATEX	CIE	CULTURA	PCR-Multiplex	
						Universal	N.m.
1	3	DGN	C	C	NEGATIVA	+	+
2	9	DGN	C	C	NEGATIVA	+	+
3	17	DGN	B	B	NEGATIVA	+	+
4	21	DGN	B	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
5	24	DGN	C	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
6	29	DGN	B	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
7	32	DGN	C	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
8	34	DGN	C	NAGATIVA	NEGATIVA	+	+
9	37	DGN	B	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
10	41	DGN	B	B	NEGATIVA	+	+
11	42	DGN	C	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
12	45	DGN	B	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
13	57	DGN	C	C	NEGATIVA	+	+
14	138	DGN	C	C	NEGATIVA	+	+
15	153	DGN	B	B	NEGATIVA	+	+
16	156	DGN	C	C	NEGATIVA	+	+
17	187	DGN	C	C	NEGATIVA	+	+
18	198	DGN	B	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
19	4	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
20	7	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
21	8	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
22	19	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
23	22	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
24	28	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
25	33	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
26	35	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
27	36	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
28	44	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
29	62	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
30	63	DGN	C	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+

LEGENDA: GRAM:coloração de Gram

DGN: diplococo Gram-negativo

CIE: contra-imunoelektroforese

PCR: reação em cadeia da polimerase

DGN: diplococo Gram-negativo

B e C: sorogrupos B e C

NR: não reagente

+: amplificação de fragmento

AMOSTRAS DO GRUPO II

Nº	AMOSTRA	GRAM	LATEX	CIE	CULTURA	PCR-Multiplex Universal N.m.	
31	67	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
32	70	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
33	83	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
34	84	DGN	B	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
35	85	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
36	88	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
37	95	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
38	100	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
39	102	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
40	104	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
41	105	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
42	106	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
43	107	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
44	108	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
45	110	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
46	112	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
47	116	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
48	118	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
49	119	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
50	126	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
51	129	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
52	139	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
53	143	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
54	144	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
55	145	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
56	154	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
57	157	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
58	160	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
59	169	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
60	170	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-

LEGENDA: GRAM: coloração de Gram
 DGN: diplococo Gram-negativo
 CIE: contra-imunoeletroforese
 PCR: reação em cadeia da polimerase
 NR: não reagente
 +: amplificação de fragmento
 -: não houve amplificação

AMOSTRAS DO GRUPO II

Nº	AMOSTRA	GRAM	LATEX	CIE	CULTURA	PCR-Multiplex Universal N.m.	
61	175	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
62	183	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
63	188	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
64	189	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
65	207	DGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
66							
67							
68							
69							
70							
71							
72							
73							
74							
75							
76							
77							
78							
79							
80							
81							
82							
83							
84							
85							
86							
87							
88							
89							
90							

LEGENDA: GRAM:coloração de Gram

DGN: diplococo Gram-negativo

CIE: contra-imunoelektroforese

PCR: reação em cadeia da polimerase

NR: não reagente

+: amplificação de fragmento

-: não houve amplificação

AMOSTRAS DO GRUPO III

Nº	AMOSTRA	GRAM	LATEX	CIE	CULTURA	PCR-Multiplex Universal N.m.	
1	10	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
2	14	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
3	15	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
4	23	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
5	40	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
6	43	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
7	48	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
8	52	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
9	66	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
10	87	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
11	91	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
12	93	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
13	94	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
14	123	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
15	124	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
16	127	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
17	130	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
18	133	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
19	135	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
20	136	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
21	137	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
22	140	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
23	141	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	+
24	159	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
25	181	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
26	184	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
27	185	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
28							
29							
30							

LEGENDA: GRAM:coloração de Gram NOB: não se observou bactérias

CIE: contra-imunoeletroforese

PCR: reação em cadeia da polimerase

NR: não reagente

+: amplificação de fragmento

-: não houve amplificação

AMOSTRAS DO GRUPO IV

Nº	AMOSTR A	GRAM	LATEX	CIE	CULTURA	PCR-Multiplex Universal N.m.	
1	38	NOB	NR	NEGATIVA	Mycobacterium sp	+	-
2	46	NOB	S. pneumoniae	NEGATIVA	S. pneumoniae	+	-
3	68	BGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
4	89	CGP	S. pneumoniae	NEGATIVA	S. pneumoniae	+	-
5	96	DGP	S. pneumoniae	NEGATIVA	S. pneumoniae	+	-
6	98	BGN	H. influenzae b	H. influenzae b	H. influenzae b	+	-
7	117	BGN	H. influenzae b	H. influenzae b	H. influenzae b	+	-
8	146	BGN	H. influenzae b	H. influenzae b	H. influenzae b	+	-
9	147	DGP	S. pneumoniae	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
10	149	BGN	NR	NEGATIVA	Klebsiella sp	+	-
11	151	BGN	H. influenzae b	H. influenzae b	NEGATIVA	+	-
12	158	CBGN	H. influenzae b	H. influenzae b	H. influenzae b	+	-
13	161	CBGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
14	166	CBGN	H. influenzae b	H. influenzae b	NEGATIVA	+	-
15	168	BGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
16	171	CBGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
17	178	NOB	NR	NEGATIVA	S. pneumoniae	+	-
18	179	CBGN	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-
19	179	CBGN	H. influenzae b	H. influenzae b	H. influenzae b	+	-
20	186	DGP	S. pneumoniae	NEGATIVA	NEGATIVA	+	-

LEGENDA: GRAM: coloração de Gram (CGP: coco Gram-positivo, DGP: diplococo Gram-positivo, BGN: bacilo Gram-negativo, CBGN: cocobacilo Gram-negativo, NOB: não se observou bactérias)

CIE: contra-imunoeletroforese

PCR: reação em cadeia da polimerase

NR: não reagente

+: amplificação de fragmento

-: não houve amplificação

AMOSTRAS DO GRUPO V

Nº	AMOSTRA	GRAM	LATEX	CIE	CULTURA	PCR-Multiplex Universal N.m.	
1	56	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
2	60	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
3	72	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
4	74	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
5	79	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
6	92	NOB	C. neoformans	NEGATIVA	C. neoformans	-	-
7	173	NOB	C. neoformans	NEGATIVA	C. neoformans	-	-
8	216	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
9	217	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
10	218	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
11	219	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
12	220	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
13	221	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
14	222	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
15	223	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
16	224	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
17	225	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
18	226	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
19	227	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
20	228	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
21	229	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
22	230	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
23	231	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
24	232	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
25	233	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
26	234	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
27	235	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
28	236	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
29	237	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
30	238	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-

LEGENDA: GRAM: coloração de Gram (NOB: não se observou bactérias)

CIE: contra-imunoeletroforese

PCR: reação em cadeia da polimerase

NR: não reagente

-: não houve amplificação

AMOSTRAS DO GRUPO V

Nº	AMOSTR A	GRAM	LATEX	CIE	CULTURA	PCR-Multiplex Universal N.m.	
31	239	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
32	240	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
33	243	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
34	244	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
35	249	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
36	250	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
37	251	NOB	NR	NEGATIVA	NEGATIVA	-	-
38							
39							
40							
41							
42							
43							
44							
45							
46							
47							
48							
49							
50							
51							
52							
53							
54							
55							
56							
57							
58							
59							
60							

LEGENDA: GRAM: coloração de Gram (NOB: não se observou bactérias)

CIE: contra-imunoeletroforese

PCR: reação em cadeia da polimerase

NR: não reagente

-: não houve amplificação

INTERVALOS DE CONFIANÇA (95%) DA TABELA 3

GRUPO	TÉCNICA	POSITIVIDADE (%)	I.C. 95%
I	PCR-MULTIPLEX	100 (19/19)	83,2-100
	CULTURA		
	BACTERIOSCOPIA	84,2 (16/19)	62,4-94,5
	LATEX		
	CIE	42,1 (8/19)	23,2-63,7
II	PCR-MULTIPLEX (UNIVERSAL)	100 (65/65)	94,4-100
	PCR-MULTIPLEX (<i>N. meningitidis</i>)	89,2 (58/65)	79,4-94,7
	BACTERIOSCOPIA	100 (65/65)	94,4-100
	LATEX	27,7 (16/65)	18,3-39,6
	CIE	13,8 (9/65)	7,5-24,3
	CULTURA	0 (0/65)	
III	PCR-MULTIPLEX (UNIVERSAL)	89,0 (24/27)	79,4-94,7
	PCR-MULTIPLEX (<i>N. meningitidis</i>)	51,8 (14/27)	34,0-69,3
	BACTERIOSCOPIA	0 (0/27)	
	LATEX		
	CIE		
	CULTURA		
IV	PCR-MULTIPLEX (UNIVERSAL)	100 (20/20)	83,9-100
	PCR-MULTIPLEX (<i>N. meningitidis</i>)	0 (0/20)	0-16,1
	BACTERIOSCOPIA		
	LATEX		
	CIE		
	CULTURA		
V	PCR-MULTIPLEX	0(0/37)	0-9,4
	CULTURA		
	BACTERIOSCOPIA		
	LATEX		
	CIE		

INTERVALOS DE CONFIANÇA A NÍVEL DE 95% DA TABELA 4

TÉCNICA	SENSIBILIDADE (%)	ESPECIFICIDADE (%)	EFICIÊNCIA DIAGNÓSTICA (%)	VALOR PREDITIVO POSITIVO (%)	VALOR PREDITIVO NEGATIVO (%)	FALSO NEGATIVO (%)
PCR-MULTIPLEX	100 (83,2-100)	100 (90,6-100)	100 (93,6-100)	100 (83,2-100)	100 (90,6-100)	0 (0-9,4)
CULTURA						
BACTERIOSCOPIA	84,2 (62,4-94,5)		94,6 (85,4-98,2)	94,6 (85,4-100)	92,5 (80,1-97,4)	7,5 (2,6-19,9)
LATEX						
CIE	42,1 (23,2-63,7)		80,4 (68,2-88,7)	80,4 (68,2-88,7)	77,0 (63,5-86,7)	23,0 (13,3-36,5)

INTERVALO DE CONFIANÇA (95%) DA TABELA 5

BACTERIOSCOPIA POSITIVA (81)	SENSIBILIDADE (%)	ESPECIFICIDADE (%)	VALOR PREDITIVO POSITIVO (%)	VALOR PREDITIVO NEGATIVO (%)
BACTERIOSCOPIA (81/81)	100 (95,5-100)	100 (95,5-100)	100 (95,5-100)	100 (95,5-100)
CULTURA (16/81)	19,8 (12,5-29,7)			
PCR-MULTIPLEX (74/81)	91,3 (83,2-95,8)			
BACTERIOSCOPIA NEGATIVA (87)	SENSIBILIDADE (%)	ESPECIFICIDADE (%)	VALOR PREDITIVO POSITIVO (%)	VALOR PREDITIVO NEGATIVO (%)
BACTERIOSCOPIA (0/30)	0 (0-11,4)	100 (93,7-100)	0	65,5 (55,5-74,7)
CULTURA (3/30)	10 (3,5-25,6)		100 (43,9-100)	67,9 (57,3-76,9)
PCR-MULTIPLEX (17/30)	56,7 (39,2-72,6)		100 (81,6-100)	81,4 (70,8-88,8)
BACTERIOSCOPIA (57/57)	-	100 (93,7-100)	(0/0) 0	(57/87) 65,5 (55,5-74,4)
CULTURA (57/57)	-		(3/3) 100 (43,9-100)	(57/84) 67,9 (57,3-76,9)
PCR-MULTIPLEX (57/57)	-		(17/17) 100 (91,6-100)	(57/70) 81,4 (70,8-88,8)

INTERVALO DE CONFIANÇA A NÍVEL DE 95% DA TABELA 6

TÉCNICA	SENSIBILIDADE (%)	ESPECIFICIDADE (%)	VALOR PREDITIVO POSITIVO (%)	VALOR PREDITIVO NEGATIVO (%)
PCR-MULTIPLEX	(91/111) 82,0 (73,8-88,0)	(57/57) 100 (93,7-100)	(91/91) 100 (96,0-100)	(57/77) 74,0 (63,3-82,5)
CULTURA	(19/111) 17,1 (11,2-25,2)	(57/57) 100 (93,7-100)	(19/91) 100 (83,2-100)	(57/149) 38,3 (30,8-46,3)
BACTERIOSCOPIA	(81/111) 73,0 (64,0-80,4)	(57/57) 100 (93,7-100)	(81/81) 100 (95,5-100)	(57/87) 65,5 (55,1-74,7)
LATEX	(34/111) 30,6 (22,8-39,7)	(57/57) 100 (93,7-100)	(34/34) 100 (89,9-100)	(57/134) 42,5 (34,5-51,0)
CIE	(17/111) 15,3 (9,7-23,2)	(57/57) 100 (93,7-100)	(17/17) 100 (81,6-100)	(57/151) 37,7 (30,4-45,7)