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

**Avaliação de um ensaio utilizando-se MULTIPLEX-PCR para a
detecção de meningites por diferentes agentes bacterianos**

Renata Chaves Albuquerque Marum

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa.Titular Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100015113

Ficha Catalográfica

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

Albuquerque-Marum, Renata Chaves ✓
A345a Avaliação de um ensaio utilizando-se MULTIPLEX-PCR para
a detecção de meningites por diferentes agentes bacterianos /
Renata Chaves Albuquerque-Marum. -- São Paulo, 2008.
66p.

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

Orientador: Martinez, Marina Baquerizo

1. Microbiologia clínica 2. Diagnóstico molecular 3. Meningite
4. Biologia molecular : Bactéria I. T. II. Martinez, Marina
Baquerizo, orientador.

616.0756 CDD

Renata Chaves Albuquerque Marum

**Avaliação de um ensaio utilizando-se MULTIPLEX-PCR para a
detecção de meningites por diferentes agentes bacterianos**

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE**

**Profa Titular Marina Baquerizo Martinez
Orientadora/presidente**

1º. examinador

2º. examinador

06/02/09

Aos meus pais, Sonia e Salvador,

...que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade,

...que se doaram por inteiro, muitas vezes renunciando aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus.

Faço da minha conquista o instrumento de gratidão por tudo que recebi de vocês e ambos são o meu exemplo de coragem, no qual me espelho para dar continuidade aos meus ideais.

Aos meus irmãos, Patrícia e Paulo, amigos e companheiros que amo muito.

E ao meu filho Lucas, meu maior amor e minha fonte inspiração.....

Dedico com muito amor este trabalho.

À Profa. Titular Marina Baquerizo Martinez, orientadora a quem serei eternamente grata pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelos ensinamentos e disciplina transmitidos, pelo carinho e amizade concedidos.

“Grande é o homem que descobre seus próprios talentos; mas, gigante é aquele que sabe descobrir os talentos dos outros...”

AGRADECIMENTOS

À querida e grande amiga Ana Carolina Ramos Moreno pela presença, amizade, carinho, companheirismo e ensinamentos dispensados.

*“Perguntei a um sábio, a diferença que havia
entre amor e amizade, ele me disse essa verdade...*

O Amor é mais sensível, a Amizade mais segura.

O Amor nos dá asas, a Amizade o chão.

No Amor há mais carinho, na Amizade compreensão.

*O Amor é plantado e com carinho cultivado,
a Amizade vem faceira, e com troca de alegria e tristeza,
torna-se uma grande e querida companheira.*

*Mas quando o Amor é sincero
ele vem com um grande amigo,
e quando a Amizade é concreta,
ela é cheia de amor e carinho.*

*Quando se tem um amigo
ou uma grande paixão,
ambos os sentimentos coexistem
dentro do seu coração.”*

William Shakespeare

As amigas Silvia Regina dos Santos, Lilian Ferri Passadori, Angélica Jean Balabakis, Stella Maria Guida, Elisabete Harummyy, Carla Taddei de Castro Neves, Lucas Gonçalves Ferreira e Tânia Sawada por estarem sempre ao meu lado, pela amizade e carinho.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Clínica: Isabel, Fernanda, Milton, Lara, Mônica, e Maryamma agradeço por todo o carinho, ajuda, amizade e companheirismo.

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia Clínica: Tatiana, Carla, Renato, Rebeca por todo o carinho, ajuda, amizade e companheirismo.

Às queridas amigas Sonia Caramico e Silene Migliorini e meu grande amigo Mauricio dos Santos, pela amizade sincera, pela ajuda, por estarem comigo nas horas boas e ruins e por me acolherem sempre que necessário com muito carinho.

À Dra. Selma Lopes Betta Ragazzi, Dr. Alfredo Elias Giglio e Dra. Milena de Paulis do Hospital Universitário por sua colaboração, atenção e disponibilidade.

À Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka pelo apoio e carinho no decorrer deste trabalho.

A Dra Ana Campa, que me ensinou a confiar no futuro e não temer os obstáculos. Hoje estou concluído um compromisso do passado graças a você. Obrigado pelo carinho!

Aos docentes do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

As funcionárias Maria Auxiliadora (Dora), Sueli, Edna, Dorlei, Carmem, Claudia e Rosângela do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela cooperação e carinho sempre dispensado.

À Universidade de São Paulo, fonte inesgotável da sabedoria, da qual tive a honra de ter sido aluna.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE SIMBOLOS
RESUMO
ABSTRACT

1- Introdução	1
2- Objetivos	18
2.1- Objetivo geral	18
2.2- Objetivos específicos	18
3- Materiais e Métodos	19
3.1-Amostras de Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	19
3.2-Espécies bacterianas e condições de cultivo	20
3.3-Obtenção do DNA bacteriano para ensaio molecular e avaliação da sensibilidade do método	20
3.3.1-Amostras de Líquido cefalorraquidiano (LCR)	20
3.3.2-Espécies bacterianas	20
3.3.2.1-Lisado bacteriano	21
3.3.2.2-Extração de DNA bacteriano	22
3.4- Avaliação da especificidade utilizando outros microrganismos	22
3.5- Desenho dos iniciadores	22
3.6- Reação da Cadeia da Polimerase	23
3.7- Eletroforese em gel de agarose	24
4- Resultados	
4.1- Reação de MULTIPLEX-PCR	25
4.2- Avaliação da sensibilidade do método MULTIPLEX-PCR	26
4.2.1- DNA bacteriano extraído por Kit	26
4.2.2- Lisado bacteriano	27

4.3-Avaliação da especificidade utilizando outros microrganismos.....	29
4.4-Aplicação da MULTIPLEX-PCR em amostras de LCR para detecção de agentes bacterianos.....	31
4.4.1- Amostras de LCR positivas para cultura e MULTIPLEX-PCR	32
4.4.2-Amostras de LCR negativas para cultura e positivas para MULTIPLEX- PCR	33
 5- Discussão.....	 40
 6- Conclusão.....	 48
 7- Referências bibliográficas.....	 49
 8- Anexos.....	 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de LCR obtidas nos Hospitais.....	19
Tabela 2 - Iniciadores empregados na reação de MULTIPLEX-PCR.....	23
Tabela 3 - Sensibilidade da MULTIPLEX-PCR: DNA bacteriano extraído por Kit.....	26
Tabela 4 - Sensibilidade da MULTIPLEX-PCR: Unidades Formadoras de Colônias (UFC) presentes no lisado bacteriano.....	28
Tabela 5 - Resultados dos ensaios moleculares (bactérias e vírus), em relação aos Grupos I, II e III e a cultura bacteriana.....	31
Tabela 6 - Resultados comparativos do ensaio molecular (para bactérias) com a Cultura Bacteriológica, em relação aos Grupos I, II e III.....	32
Tabela 7 - Dada clínicos e laboratorial dos 13 pacientes com cultura negativa e MULTIPLEX-PCR positivo.....	35
Tabela 8 - Resultados comparativos dos ensaios moleculares (bactérias e vírus) com o número de células presentes no LCR, em relação aos Grupos I, II e III.....	37
Tabela 9 - Resultados comparativos dos ensaios moleculares (bactérias e vírus) com o número de neutrófilos presentes no LCR, em relação aos Grupos I, II e III.....	37

Tabela 10 - Resultados comparativos dos ensaios moleculares (bactérias e vírus) com a determinação de glicose do LCR, em relação aos Grupos I, II e III.....37

Tabela 11 - Resultados comparativos dos ensaios moleculares (bactérias e vírus) com a determinação de proteínas do LCR, em relação aos Grupos I, II e III.....38

Tabela 12 - Resultados comparativos dos ensaios moleculares (bactérias e vírus) com a determinação de lactato, em relação aos Grupos I, II e III.....38

Tabela 13 - Resultados comparativos dos ensaios moleculares (bactérias e vírus) com a Coloração de Gram, em relação aos Grupos I, II e III.....38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da diluição realizada para o ensaio de sensibilidade do método de MULTIPLEX-PCR em função do número de colônias. O ensaio foi realizado em duplicata.....21

Figura 2 - MULTIPLEX-PCR para a determinação de agentes etiológicos da meningite bacteriana. As espécies bacterianas *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* foram utilizadas na MULTIPLEX-PCR para avaliar a especificidade da reação. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,2 % por 90 minutos a 9,5 V/cm. 1- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®), 2- *Streptococcus agalactiae* (*fbsA*, 529 pb e 16S *rDNA*, 283 pb), 3- *Streptococcus pneumoniae* (*lytA*, 395 pb e 16S *rDNA*, 283 pb), 4- *Neisseria meningitidis* (*crtA*, 110 pb e 16S *rDNA*, 283 pb), 5- *Haemophilus influenzae* (*p6*, 177 pb e 16S *rDNA*, 283 pb), 6 – *Escherichia coli* (16S *rDNA*, 283 pb), 7- *Listeria monocytogenes* (16S *rDNA*, 283 pb).....25

Figura 3 - Teste de sensibilidade da MULTIPLEX-PCR realizado com diluições seriadas de DNA extraído por Kit. Diferentes diluições do DNA bacteriano foram testadas na reação de MULTIPLEX-PCR para avaliar a sensibilidade do método. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,2 % por 90 minutos a 9,5 V/cm. A figura ilustra o ensaio de *Haemophilus influenzae* (*p6*, 177 pb e 16S *rDNA*, 283pb), *Neisseria meningitidis* (*crtA*, 110 pb e 16S *rDNA*, 283 pb), *Streptococcus pneumoniae* (*lytA*, 395 pb e 16S *rDNA*, 283 pb) e *Streptococcus agalactiae* (*fbsA*, 529 pb e 16S *rDNA*, 283 pb). 1- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®), 2- 1000 pg/μL, 3– 500 pg/μL, 4- 100 pg/μL, 5 – 10 pg/μL, 6- 1 pg/μL, 7- 0,1 pg/μL.27

Figura 4 - Teste de sensibilidade da MULTIPLEX-PCR realizado com diluições seriadas de lisado bacteriano. Diferentes diluições do lisado bacteriano foram testadas na reação de MULTIPLEX-PCR para avaliar a sensibilidade do método. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,2 % por 90 minutos a 95 V/cm. A figura ilustra o ensaio de *Neisseria meningitidis* (*crtA*, 110 pb e *16S rDNA*, 283 pb) e *Haemophilus influenzae* (*p6*, 177 pb e *16S rDNA*, 283pb). 1- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®), 2 – 20.000 UFC /reação, 3 – 2.000 UFC /reação, 4 - 200 UFC/reação e 20 UFC/reação.....29

Figura 5 - Teste de sensibilidade da MULTIPLEX-PCR realizado com diluições seriadas de lisado bacteriano. Diferentes diluições do lisado bacteriano foram testadas na reação de MULTIPLEX-PCR para avaliar a sensibilidade do método. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,2 % por 90 minutos a 95 V/cm. A figura 5A ilustra o ensaio de *Streptococcus agalactiae* (*fbsA*, 529 pb e *16S rDNA*, 283 pb).1- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®), 2 – 20.000 UFC /reação, 3 – 2.000 UFC /reação, 4 – 1.000 UFC./reação e a figura 5B ilustra o ensaio de *Streptococcus pneumoniae* (*lytA*, 395 pb e *16S rDNA*, 283 pb) 1- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®), 2 – 20.000 UFC /reação, 3 – 2.000 UFC /reação, 4 – 1.000 UFC./reação e 200 UFC/reação.....29

Figura 6 - MULTIPLEX-PCR realizado com diferentes microorganismos. Lisados de diferentes gêneros bacterianas e amostras clínicas positivas para *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* foram testadas na reação de MULTIPLEX-

PCR para avaliar as possíveis bandas amplificadas. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,2 % por 90 minutos a 9,5 V/cm.

1- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®), 2- *Enterococcus* sp, 3- *Streptococcus pyogenes*, 4- *Cryptococcus neoformans*, 5- *Candida albicans*, 6- *Staphylococcus aureus*, 7- *Escherichia coli*, 8- *Salmonella* sp, 9- *Pseudomonas aeruginosa*, 10-*Shigella* sp, 11- *Listeria monocytogenes* 12- *Streptococcus agalactiae*,13- *Klebsiella pneumoniae*, ,14- *Citrobacter diversus*, 15- *Neisseria gonorrhoeae*, 16- *Neisseria meningitidis*, 17- *Streptococcus agalactiae*, 18- *Haemophilus influenzae*, 19- *Streptococcus pneumoniae*, 20- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®).....30

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

CO₂ – dióxido de carbono

% - porcentagem

cel/mm³ – células por milímetro cúbico

cm - centímetros

DNA – ácido desoxirribonucleico

F - Forward

h- hora (s)

H. influenzae – *Haemophilus influenzae*

Kb – kilo pares de base

LCR – líquido ou líquido cefalorraquidiano

MgCl₂ – cloreto de magnésio

M – molar

min- minuto(s)

mg/dL – miligrama (s) por decilitro (s)

mg/mL – miligrama (s) por mililitro (s)

mL – mililitro(s)

mM- milimolar

nM- nanomolar

N. meningitidis – *Neisseria meningitidis*

PCR – reação da cadeia da polimerase

μL - microlitro (s)

μg/mL – micrograma(s) por mililitro(s)

μM – micromolar

ng – nanograma (s)

ng/μL – nanograma (s) por microlitro (s)

pg/μL – picograma (s) por microlitro (s)

pb- pares de bases

R- reverse

s- segundo (s)

SNC- Sistema Nervoso Central

S.agalactiae – *Streptococcus agalactiae*

S.pneumoniae – *Streptococcus pneumoniae*

U- unidade (s)

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFC /mL – Unidades Formadoras de Colônias por microlitro (s)

UFC /reação – Unidades Formadoras de Colônias por reação

V/cm – voltagem por centímetros

λ - comprimento de onda

RESUMO

Albuquerque - Marum, R.C. **Avaliação de um ensaio utilizando-se MULTIPLEX-PCR para a detecção de meningites por diferentes agentes bacterianos**. 2008. 66 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2008.

No presente trabalho, foi realizada uma MULTIPLEX-PCR para a detecção do DNA bacteriano de *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* e outros possíveis agentes etiológicos bacterianos das meningites. Este ensaio combina cinco diferentes iniciadores que detectam simultaneamente o gene *crtA* de *N. meningitidis*, o gene *p6* de *H. influenzae*, o gene *fbsA* de *S. agalactiae*, o gene *lytA* de *S. pneumoniae* e o gene universal *16S rDNA* para identificar a presença de agente bacteriano. Foram analisadas 447 amostras de LCR, o ensaio detectou 27 amostras positivas para cultura bacteriana e 13 amostras com resultado de cultura negativa. Estas amostras com cultura negativa apresentavam alterações bioquímicas, hematológicas, imunológicas ou microbiológicas (bacterioscopia) sugestivas de meningite, estes dados auxiliaram na análise dos resultados do MULTIPLEX-PCR. Este ensaio não apresentou reações inespecíficas com fungos, vírus e com outros agentes bacterianos testados (amplificando somente o gene *16S rDNA*). A MULTIPLEX-PCR é um ensaio rápido, confiável, de fácil execução e facilmente implementável para a confirmação de meningite bacteriana. E este método pode auxiliar no diagnóstico de meningite com cultura de LCR negativa, particularmente para pacientes que previamente iniciaram antibioticoterapia e no diagnóstico diferencial de meningite bacteriana ou viral.

Palavras-chave: MULTIPLEX-PCR, bactérias, líquido, meningite.

ABSTRACT

Albuquerque - Marum, R.C. **A Test Evaluation using a MULTIPLEX-PCR for the meningitis detection by different bacterial agents.** 2008. 66 f. Dissertation (master) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2008.

In this work, a MULTIPLEX-PCR has conducted for the bacterial DNA detection of *S. agalactiae*, *S.pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* and other possible etiologic bacterial meningitis agents. This test combines five different primers that detect simultaneously the *crtA* gene of *N. meningitidis*, the *p6* gene of *H. influenzae*, the *fbsA* gene of *S. agalactiae*, the *lytA* gene of *S. pneumoniae* and the *16S rDNA* universal gene to identify the presence of bacterial agent. From the 447 samples of CSF that were analyzed, the test detected 27 positive samples for bacterial culture and 13 samples with the result of negative culture. These negative culture samples presented biochemical changes, hematological, immunological or microbiological (bacterioscopy) suggestive of meningitis, these data helped in the analysis of the MULTIPLEX-PCR results. This test showed no nonspecific reactions with fungi, viruses and other bacterial agents tested (only amplifying the gene *16S rDNA*). The MULTIPLEX-PCR test is a fast, reliable, easy to implement and easily implementable for of bacterial meningitis confirmation. And this method can aid in the meningitis diagnosis with negative culture of CSF, particularly for patients who previously started antibiotic therapy and in the differential diagnosis of bacterial or viral meningitis.

Keywords: MULTIPLEX-PCR, bacteria, cerebrospinal fluid, meningitis

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Central (SNC) é formado por encéfalo e medula espinhal, estas estruturas são protegidas por membranas que são designadas de meninges. As meninges são divididas em pia-máter (mais interna), aracnóide (central) e dura-máter (mais externa). Entre a pia-máter e aracnóide há um espaço denominado espaço subaracnóideo, que é preenchido pelo líquido cefalorraquidiano (LCR). O LCR é produzido por células secretoras do plexo coróide, e seu volume total em um adulto corresponde a aproximadamente 150 mL, o qual é trocado a cada 5-7 h (WATSON & SCOTT, 1995). O LCR possui as funções de suporte físico do cérebro, transporte de biomoléculas, remoção dos metabólitos como lactato e CO₂ e de manter a pressão intracraniana constante (RAY *et al.*, 1993).

Além das meninges e do LCR, o SNC possui outra estrutura protetora, designada como barreira hematoencefálica, que impede o acesso de microorganismos, células e outras estruturas ao LCR e aos tecidos cerebrais. Esta barreira possui além da função protetora, a de regular o transporte de proteínas, glicose e eletrólitos para o SNC (RAY *et al.*, 1993).

Os principais processos infecciosos que comprometem o SNC são: meningite aguda, meningite crônica, encefalite, mielite, neurite, abscesso cerebral, empiema subdural, abscesso epidural, flebite intracraniana supurativa e infecções associadas tanto a procedimentos invasivos como a dispositivos implantados no SNC (RAY *et al.*, 1993). A patologia mais freqüente do SNC é a meningite, que consiste na infecção do espaço subaracnóideo e das membranas leptomeníngeas (FEIGIN & PEARLMAN, 1998).

Existem diversos fatores que podem favorecer o desenvolvimento de meningite. Os recém-nascidos possuem maior predisposição ao desenvolvimento desta patologia devido à imaturidade do sistema imunológico e ao aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica nesta fase da vida. Crianças e adultos não que não foram vacinados são mais susceptíveis às infecções, muitos adultos não receberam imunização adequada na infância e algumas crianças não tiveram acesso às vacinas contra meningococo e pneumococo. Estas vacinas não são oferecidas pela rede pública e apresentam um alto custo nas clínicas de vacinação.

Alcoolismo, diabetes, esplenectomia e imunossupressão são considerados fatores de risco. As condições climáticas e sociais, precedente ou concomitante à infecção viral, o estado de imunidade do paciente e os fatores de virulência do microorganismo podem favorecer o desenvolvimento da doença (VAN DEUREN *et al.*, 2000).

O acesso dos agentes etiológicos ao SNC pode ocorrer pelas vias hematogênica (bacteremias e endocardites), direta (através de trauma ou procedimentos invasivos), intraneural (através dos nervos, ocorre com o vírus da raiva) ou por contigüidade (otite média, mastoidite, sinusite e outros). Assim, a meningite pode ser uma complicação de algumas infecções intracranianas comuns como a sinusite e a otite média, onde os fatores que favorecem o desenvolvimento da doença são as condições do hospedeiro, a virulência do agente etiológico e o tratamento inicial inadequado (AIMONI *et al.*, 2005). Em neonatos, a fonte de infecção geralmente é a mãe (transplacentária ou durante o parto) ou ambiente pós-natal (FARIAS *et al.*, 1996).

São necessários quatro pré-requisitos para a maioria dos microorganismos alcançarem o SNC e causar a doença: (i) exposição ao patógeno, (ii) colonização da mucosa, (iii) passagem pela mucosa e (iv) sobrevivência do microorganismo na corrente sanguínea. Ao atingir o espaço subaracnóideo, as bactérias encontram condições adequadas para se multiplicarem. As bactérias Gram-negativas liberam lipopolissacárideo (endotoxina) e as Gram-positivas liberam elementos da parede celular, como peptídeoglicanas e ácidos teicóicos. Estas substâncias, uma vez liberadas, estimulam os macrófagos cerebrais e as células do endotélio capilar a produzirem mediadores químicos que desencadeiam a resposta inflamatória da meningite (FARIAS *et al.*, 1996). Durante os últimos 15 a 20 anos tem se procurado entender a patogênese e fisiopatologia das meningites bacterianas, na tentativa de melhorar o quadro do paciente. Muitas vezes, o hospedeiro é incapaz de controlar a infecção do SNC e a resposta inflamatória desencadeada pode ser responsável pelos efeitos adversos que ocorrem durante a meningite bacteriana. Assim, uma série de eventos complexos envolvendo citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas parecem ser responsáveis pela disfunção cerebral gerada por esta patologia (SCHELD *et al.*, 2002).

Os agentes etiológicos da meningite bacteriana são diversos e a susceptibilidade parece variar com a idade, onde são encontrados grupos distintos

de microorganismos afetando recém-nascidos, crianças entre 1 mês a 15 anos e adultos (GRAY & NORDMANN, 1997).

A faixa etária de 0 a 30 dias de vida, os principais agentes são *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, e outras bactérias da família das Enterobacteriaceae. Na idade de 3 meses a 10 anos, os agentes mais freqüentes são *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*. Nas crianças maiores de 5 anos e nos adultos os responsáveis pela infecção são *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*, cuja prevalência depende da idade do indivíduo e da colonização da mucosa da nasofaringe pelo microorganismo (RAY *et al.*, 1993).

Neisseria meningitidis (meningococo) é um diplococo Gram-negativo, oxidase e catalase positiva, imóvel, não esporulado, com temperatura ótima de crescimento de 35 a 37°C, utiliza carboidratos pela via oxidativa e possui cápsula. A cápsula é um importante fator de virulência e suas propriedades antigênicas são utilizadas na classificação dos meningococos (TZENG & STEPHENS, 2000).

Os meningococos são tradicionalmente classificados pelo sistema de tipagem sorológica baseada na diferença da estrutura da cápsula (sorogrupo), proteínas de membrana externa porinas (sorotipos), outras proteínas externas (sorosubtipos) e lipooligosacarídeo (imunotipagem) (TZENG & STEPHENS, 2000). Mas devido à alta freqüência da variação de expressão e estrutura de membrana externa dos meningococos, este sistema de sorotipagem pode não identificar algumas cepas (TZENG & STEPHENS, 2000). De acordo com a classificação baseada nos antígenos capsulares, existem os seguintes sorogrupos conhecidos, que são A, B, C, 29-E, H, I, K, L, W-135, X, Y e Z. Na literatura são encontrados 20 sorotipos (antígenos OMP classe 2/3) e 10 subtipos (antígenos OMP classe 1) (BAINES & HART, 2003; TZENG & STEPHENS, 2000). *N. meningitidis* dos sorogrupos A, B, C e mais recentemente W135 e Y estão associadas com 90% das doenças (TZENG & STEPHENS, 2000).

Os meningococos são responsáveis por um grande número de doenças em seres humanos como artrite séptica, pneumonia, pericardites purulentas, conjuntivites, otites, sinusites e uretrites (TZENG & STEPHENS, 2000). Este microorganismo está mais freqüentemente associado com meningite e sepse severa (meningococemia) ou a combinação de ambas (PERKINS *et al.*, 1996). A meningite inicia-se pela colonização da mucosa da nasofaringe, a bactéria atinge a corrente

sangüínea e, em seguida, o SNC. A meningococemia pode evoluir para uma meningite. Uma importante característica clínica da meningococemia é a presença de 30 a 60% de erupção cutânea petequial ou púrpura nos pacientes, com a presença ou não de meningite.

A mucosa nasorofaríngea humana é o único reservatório natural de *N. meningitidis* (Van DEUREN *et al.*, 2000), onde colonizam assintomaticamente de 5 a 10% de adultos em períodos não epidêmicos. A colonização é um importante processo de imunização, o qual pode proteger contra doenças futuras (TZENG & STEPHENS, 2000). Estes portadores assintomáticos são cruciais para difusão da doença, pois a maioria das infecções é adquirida pela exposição a esses indivíduos. A transmissão pode ocorrer de forma direta, pelas secreções das vias nasais, via oral ou pela inalação de partículas. O maior impacto da doença meningocócica está entre as crianças, onde a razão da transmissão e da proporção de casos fatais em crianças é vinte vezes maior do que na população adulta. Em surtos, também são afetadas crianças mais velhas, adolescentes e adultos (TZENG & STEPHENS, 2000).

O contato com portadores ou doentes em locais fechados e aglomerados pode proporcionar um aumento na transmissão do meningococo, além de um aumento nas doenças invasivas (TZENG & STEPHENS, 2000). Os fumantes passivos e ativos também são identificados como um importante fator de risco para doença meningocócica, pois o fumo pode aumentar em 20% a probabilidade de adquirir a doença (TZENG & STEPHENS, 2000).

Os fatores de virulência dos meningococos são a cápsula polissacarídica, pili tipo IV, lipooligosacarídeo (LOS), adesinas como Opa e Opc, proteínas de membrana externa (PorA e PorB) e proteínas para aquisição de ferro. A cápsula tem ação antifagocitária e antibactericida e isto auxilia na sua sobrevivência durante a invasão sangüínea e líquórica (TZENG & STEPHENS, 2000). A cápsula é essencial para a proteção do microorganismo (como exemplo a dessecação e morte por fagocitose), facilitando a transmissão, a propagação e à sua sobrevivência externa e em compartimentos intracelulares (vacúolos fagocíticos) (TZENG & STEPHENS, 2000). O pili tipo IV e as proteínas de membrana externa (Opa e Opc) estão associados com a aderência à célula do hospedeiro (PUJOL *et al.*, 1999; DEGHMANE *et al.*, 2000) e são codificado pelo gene *pilE* e *pilS*, *opa* e *opc*, respectivamente (DAVIDSEN *et al.*, 2006). O LOS também é um grande fator de

virulência, sendo liberado na corrente sanguínea em um processo de vesiculação da parede celular, e funciona como uma endotoxina, que é responsável pelo choque séptico que pode ocorrer na meningococemia (TZENG & STEPHENS, 2000). A família dos genes que codificam LOS são designados de *lgt*, designados como A,B,C,D,E e G.(BERRINGTON *et al.*, 2002)

Outro importante agente da meningite é *H. influenzae*, um cocobacilo Gram-negativo, oxidase negativa e anaeróbio facultativo. É um microorganismo fastidioso que necessita de fatores de crescimento V e X, correspondentes à NAD coenzima I e à hemina, respectivamente. *H. influenzae* faz parte da microbiota do aparelho respiratório superior e, em alguns casos, do trato genital feminino (GILSDORF *et al.*, 1997). O ser humano é o único reservatório desta bactéria (GILSDORF *et al.*, 1997). *H. influenzae* é dividido em espécies capsuladas e não capsuladas designadas também como tipáveis ou não tipáveis (REILLY *et al.*, 1999). As espécies capsuladas são divididas em sorotipos, de acordo com a antigenicidade do polissacarídeo capsular, sendo designadas como a, b, c, d, e, f.

Em torno de 50 a 80% de indivíduos saudáveis são colonizados por cepas não capsuladas de *H. influenzae* e 5% são colonizados por cepas capsuladas (GILSDORF *et al.*,1997). Este microorganismo é o agente etiológico de diversas patologias, tanto em adultos como em crianças, como bacteremia, meningite, epigloteite, pneumonia, artrite séptica e celulite bucal (GILSDORF *et al.*, 1997). A espécie de *H. influenzae* tipo b (Hib) foi responsável por 95% das doenças invasivas (TURK *et al.*, 1982) como meningites e bacteremias, mas com o desenvolvimento da vacina, houve uma queda na sua incidência e um aumento dos outros sorotipos, como a, c, d, f e das espécies não capsuladas. Em países, onde a vacina não foi introduzida, Hib continuam sendo responsável por cerca de 96% de todas as doenças (SINGHI *et al.*, 2001).

As cepas não capsuladas são responsáveis por otite média, sinusite, bronquites, pneumonia, bacteremia e ocasionalmente podem romper a barreira epitelial e causar septicemia, endocardite e artrite piogênica (YADAV *et al.*, 2003).

Os componentes celulares importantes na patogênese são cápsula, LOS, fimbrias, proteases de imunoglobulina e as proteínas de membrana externa (REILLY *et al.*, 1999). A cápsula protege o microorganismo contra a fagocitose e a região responsável pela sua síntese é designada como *cap* (ISHIWADA *et al.*, 2004). Esta região é dividida em 1, 2 e 3, sendo 1 e 3 conservadas entre as espécies capsuladas

e a dois considerada espécie - específica (ISHIWADA *et al.*, 2004). O pili é responsável pela aderência do *H. influenzae* à célula epitelial do aparelho respiratório e para sua biossíntese são necessários cinco genes, *hifA* ao *hifE* (ECEVIT *et al.*, 2004) e estes genes foram clonados e seqüenciados somente em cepas de *H. influenzae* tipo b e cepas não capsuladas (GILSDORF *et al.*, 1997). O LOS possui atividade biológica como endotoxina, adesão às células do hospedeiro e resistência ao poder bactericida do soro e os genes que codificam a biossíntese de LOS são designados de *lic1A*, *lic2A*, *lic3A*, *lex-2* and *lgtC*, (RAO *et al.*, 1999). Algumas cepas de Hib e espécies não capsuladas expressam fimbrias designadas como Hif, que têm função de aglutinar hemácias humanas e aderir nas células epiteliais (ST GEME III *et al.*, 1996)

H. influenzae apresenta 36 proteínas de membrana externa (OMP), as mais abundantes são designadas de P1, P2, P4, P5 e P6 em ordem decrescente de peso molecular (LOEB *et al.*, 1980; KAUR *et al.*, 2003). Devido ao interesse destas proteínas no desenvolvimento de vacinas, muito é conhecido sobre suas propriedades imunogênicas e antigênicas, mas pouco se sabe sobre suas funções biológicas (REILLY *et al.*, 1999). E as cepas não capsuladas expressam duas proteínas de alta massa molecular designadas como HMW1 e HMW 2 (KAUR *et al.*, 2003).

Streptococcus agalactiae, também designado como Estreptococo do Grupo B, segundo Lancefield (1933). É um coco Gram-positivo, β -hemolítico, catalase negativa, bile esculina negativa, ausência de crescimento em 6,5% de cloreto de sódio, resistente a bacitracina 0,04U, hipurato de sódio e produtor do fator CAMP.

S. agalactiae foi primeiramente isolado em mastite bovina, mas a partir de 1970 emergiu como um importante patógeno humano. Atualmente é um importante agente de infecções invasivas severas em recém-nascidos como pneumonia, sepse e meningite. Em adultos (particularmente idosos) e imunocomprometidos são responsáveis por celulite, artrite, infecções urinárias e endocardites (SPELLERBER *et al.*, 2000).

Essa espécie bacteriana é dividida em nove sorotipos, de acordo com a cápsula de polissacarídeo. Todas as espécies clinicamente isoladas expressam uma das cápsulas de polissacarídeo. Os agentes mais prevalentes nas doenças invasivas são os sorotipos Ia, Ib, II e III (SCHUCHAT *et al.*, 1998), sendo o III o mais

freqüente em doenças neonatais, em torno de 80% dos casos (SCHUCHAT *et al.*, 1998; NIZET & RUBENS, 2000).

Este microorganismo é comumente encontrado no trato gastrointestinal e geniturinário humano. A colonização do reto e da vagina em mulheres grávidas pode levar ao desenvolvimento de doenças bacterianas invasivas em recém-nascidos, devido à exposição antes ou durante o parto.

A prevalência da colonização vaginal nas mulheres grávidas nos países europeus corresponde de 10 a 20 % e a incidência de infecções neonatais de 0,5 a 2 % por 1000 nascimentos (TRIJBELS-SMEULDERS *et al.*, 2004).

Em 1996, o *Center for Disease Control* (CDC) publicou um guia que recomenda a triagem de portadores de *S. agalactiae*, baseados em fatores de risco (ruptura da placenta acima de 18 horas, contrações antes da 37ª semana, febre acima de 38°C durante o parto) ou testes microbiológicos em mulheres grávidas entre a 35ª e 37ª semanas de gestação (LAW *et al.*, 2005). As pacientes positivas para este microorganismo ou com a presença de algum fator de risco devem receber profilaxia antimicrobiana intraparto, como penicilina, ampicilina, clindamicina ou eritromicina, para impedir a transmissão de bactérias da mãe para o feto e assim reduzir a incidência de doença por *S. agalactiae* em recém-nascidos. A introdução deste esquema levou uma redução de 70% dos casos de infecções neonatais por esse agente etiológico.

A partir de 2002, a triagem passou a ser obrigatoriamente microbiológica levando a uma maior redução no número de casos de infecções neonatais, em torno de 82% (LAW *et al.*, 2005). Nos EUA esta triagem é praticada; contudo, no Reino Unido e em muitos países da Europa, não é praticada e nem recomendada (LAW *et al.*, 2005).

As infecções neonatais causadas por *S. agalactiae* são divididas em dois tipos: logo após o nascimento (precoces) ou mais tardiamente (tardia).

As infecções precoces são as mais comuns e ocorrem na primeira semana de vida, entre zero a 6 dias após o nascimento. Noventa por cento dos casos ocorrem em menos de 24 horas após o nascimento, quando o contato com o microorganismo se dá antes ou durante o parto (EDWARDS *et al.*, 2001). Algumas infecções podem ocorrer durante a passagem da criança pelo canal de parto, onde uma infecção pode ser estabelecida pelo cordão umbilical, trato respiratório ou

abrasão da pele (LAW *et al.*, 2005). Outra provável forma de infecção é a propagação ascendente do microorganismo do trato genital materno através da ruptura da placenta, placenta intacta ou com aspiração/ingestão do líquido amniótico (LAW *et al.*, 2005). É no líquido amniótico que a bactéria se multiplica, permitindo a colonização das vias respiratórias do feto. Ao entrar no aparelho respiratório, a bactéria pode desencadear uma pneumonia e, ainda, pode se propagar na corrente sanguínea e causar septicemia. A disseminação na corrente sanguínea permite que a bactéria se estenda para múltiplos sítios do corpo, onde subsequente penetração nos tecidos pode resultar em outras manifestações, tais como meningite e osteomielite (LINDAHL *et al.*, 2005).

As infecções tardias são geralmente definidas como as infecções em neonatos que ocorrem entre a primeira semana de vida até 90 dias (LAW *et al.*, 2005). Esse tipo de infecção é menos freqüente e pouco se sabe sobre sua patogênese, mas a transmissão horizontal da mãe para o filho explica muitas infecções durante este período. Em alguns casos, ocorre em epidemias nosocomiais, que afetam neonatais prematuros que provavelmente adquiriram a bactéria por transmissão horizontal de pessoas da enfermaria. As manifestações mais freqüentes são meningites e bacteremias, sem um foco de infecção. A mortalidade é menor em relação às infecções mais precoces, em torno de 2 a 6%. A proporção de recém-nascidos que sobrevivem a infecções por *S. agalactiae* e que apresentam seqüelas é alta (acima de 50%) (EDWARDS *et al.*, 2001). A diminuição na incidência da doença tem ocorrido devido ao uso de antibióticos intraparto.

A cápsula, proteínas de superfície e proteínas secretadas são fatores relacionados com a virulência deste microorganismo (GLASER *et al.*, 2002). A cápsula é um importante fator de proteção imunológica (WATANABE *et al.*, 2002). As proteínas de superfície apresentam um papel importante durante a infecção pela interação com a célula do hospedeiro e/ou evasão do patógeno. As proteínas FbsA (SCHUBERT *et al.*, 2002; GUTEKUNST *et al.*, 2004), ScpB (BECKMANN *et al.*, 2002) e Lmb (SPELLERBERG *et al.*, 1999) interagem com componentes da matrix extracelular, como fibrinogênio, fibronectina e laminina, permitindo a invasão do epitélio pulmonar (PIETROCOLA *et al.*, 2005). Estas proteínas são codificadas pelos genes *fbsA* (SCHUBERT *et al.*, 1999), *scpB* (LINDAHL *et al.*, 2005) e *lmb* (LINDAHL *et al.*, 2005), respectivamente.

Outras proteínas envolvidas na interação com a célula do hospedeiro são o fator CAMP e as proteínas da família Alp (α , Alp2, Rib e R28). Existem outras proteínas pouco estudadas como a proteína β que interagem com componentes do sistema imune, a proteína Sip (proteína de superfície imunogênica) e a proteína SpB1 que está relacionada com a internalização da bactéria (ADDERSON *et al.*, 2003).

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é um coco Gram-positivo, α -hemolítico, catalase, crescimento em bile-esculina e cloreto de sódio negativo, sensível a optoquina 5 μ g/mL, bile solubilidade positivo e capsulado. Na literatura estão descritos 90 sorotipos, classificados de acordo com a antigenicidade da sua cápsula de polissacarídeo (HOSKINS *et al.*, 2001). Os sorotipos prevalentes no Brasil, entre as cepas invasivas, são 1, 3, 5, 6A, 6B, 14, 18C, 19F e 23F. Os sorotipos mais prevalentes em crianças menores de 5 anos são 1, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Os pneumococos fazem parte da microbiota do aparelho respiratório superior, colonizando 40% dos seres humanos (MESSMER *et al.*, 1995).

S. pneumoniae é um importante patógeno humano, um dos principais agentes de pneumonia adquirida na comunidade, responsável por 40% dos casos, e esta associado com meningite, sinusite, bronquite e otite média em crianças e adultos (MESSMER *et al.*, 1997). É uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (JEDRZEJAS *et al.*, 2001). A incidência de doença pneumocócica é particularmente alta em crianças abaixo de cinco anos, adultos, idosos e pacientes imunocomprometidos (OGUNNIYI *et al.*, 2002; World Health Organization, 1997).

A cápsula de polissacarídeo é seu principal fator de virulência, com função antifagocitária. Outros fatores de virulência importantes são as proteínas de superfície PspA, CbpA e Psa A, pneumolisina (Ply) e autolisina (LytA) (BALACHANDRAN *et al.*, 2001) que são codificadas pelos genes *psbA*, *cbpA*, *psa A*, *ply* e *lytA*, respectivamente (OGUNNIYI *et al.*, 2002). A proteína PspA liga-se a lactoferrina e tem função de retirar ferro da nasofaringe (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 1999) e interferir na ativação do sistema complemento (OGUNNIYI *et al.*, 2002). A pneumolisina apresenta efeito citotóxico, atuando diretamente no epitélio pulmonar, inibindo a resposta imune específica e não específica do hospedeiro. CbpA é estruturalmente relacionada com PspA, e é importante para aderência do microorganismo nas células pulmonares (ROSENOW *et al.*, 1997). A autolisina LytA,

codificada pelo gene *lytA*, é conhecida por degradar a parede celular, liberando produtos que são responsáveis por desencadear inflamação e toxicidade em modelo animal (BALACHANDRAN *et al.*, 2001). Assim, estas proteínas possuem uma ampla atividade biológica, indicando que elas agem em diferentes estágios do processo de patogenicidade (OGUNNIYI *et al.*, 2002).

A incidência desses microorganismos em meningites está bem documentada em diversos países. Em 1986, 45% dos casos de meningite nos Estados Unidos eram causadas por *H. influenzae*, mas com a implementação do esquema de vacinação ocorreu uma drástica redução (SCHUCHAT *et al.*, 1997). A vacinação tem mudado substancialmente a epidemiologia das meningites bacterianas durante as últimas duas décadas. O Brasil iniciou a introdução do esquema de vacinação a partir de 1999, para menores de 2 anos de idade; em São Paulo houve uma redução de 12,1 para 1 caso por 100.000 habitantes (BEPA 5). Segundo dados do SINAN/DDTR/CVE no Estado São Paulo, em 2003, a incidência de meningite bacteriana por meningococo foi de 26%, pneumococo 12,3%, *H. influenzae* de 1,2%, tuberculose 2,7%, outros agentes etiológicos 8,3% e sem agente especificado 48,3%.

A incidência de meningite adquirida em comunidade é 2,6 a 6 casos por 100.000 adultos por ano em países em desenvolvimento, onde os agentes mais freqüentes são *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*.

A incidência de *N. meningitidis* apresenta variações entre 1 caso/100.000 habitantes na França e Estados Unidos e 4-5 casos/100.000 habitantes na Inglaterra, Escócia e Espanha. No período de 1996 a 2001, a maior incidência de meningite nos Estados Unidos foi principalmente pelo sorogrupo A (39%), seguido pelo sorogrupo C (31%), sorogrupo B (23%) e sorogrupo W135 (2%). No Canadá e na Europa há um predomínio dos sorogrupos B e C. Na literatura, existem relatos que os sorogrupos A e W135 têm sido responsáveis por epidemias no continente africano (BEPA 17).

No Brasil, o coeficiente médio de incidência da meningite por *N. meningitidis* é de 3,32/100.000 habitantes e a letalidade corresponde a 19,4%, segundo dados da Sinam/SVS/MS (Sistema Nacional de Agravos Notificáveis, Secretaria de Vigilância da Saúde, do Ministério da Saúde) (BEPA 11). No período de 1995 a 2003, a maior incidência do desenvolvimento da doença ocorreu em crianças menores de 4 anos de idade, em torno de 50% dos casos. Houve um predomínio de meningite com

meningococemia no período de 1998 a 2000, e a partir 2000 a 2003 passou a predominar meningite sem meningococemia. Na década de 70, ocorreu um importante surto no país, com predomínio dos sorogrupos A e C. Em 1988, houve uma epidemia causada pelo sorogrupo B. No período de 1990 a 2002, o sorogrupo B tinha maior incidência e, a partir deste período, o sorogrupo C passou a ser predominante (BEPA 5). A letalidade apresenta-se em torno de 18,8% e uma patologia com sazonalidade, ocorrendo principalmente no inverno

No período 1994 a 2007, foram notificados casos de Doença Meningocócica (DM) no Estado de São Paulo, nos municípios de Itapeva, Estrela D'Oeste, Guarujá, São Jose do Rio Preto e comunidade de Heliópolis no Distrito Administrativo de Ipiranga - São Paulo. Os casos que os microorganismos foram identificados e tipados pertenciam principalmente ao sorogrupo C. As medidas profiláticas desses municípios foram iniciar a quimioprofilaxia e o esquema de vacinação de acordo com a faixa etária (BEPA 11, 37, 44 e 47).

No período de 1990 a 2004, a incidência de meningites por *S. pneumoniae* no Estado de São Paulo foi de 1 – 1,5 casos por 100.000 habitantes, com taxa de letalidade em torno de 28 a 29%, sendo a faixa de maior risco de adoecer e letalidade para crianças menores de 1 ano e idosos. (BEPA 5). Na África, a incidência de meningite é 10-20 casos/ 100.000 pessoas por ano, que é dez vezes maior que no norte da Europa e Estados Unidos (GREENWOOD *et al.*, 1987). A maioria dos casos reportados ocorre em menores de 2 anos e maiores de 60 anos, ambos grupos de alto risco (GREENWOOD *et al.*, 1987). A razão de casos fatais de meningites pneumocócicas é 5 a 10 vezes maior que meningites meningocócicas (LEIMKUNDEL *et al.*, 2005). No Brasil, observa-se um predomínio de *N. meningitidis* e *S. pneumoniae* como agentes etiológicos das meningites bacterianas em geral.

A introdução da vacina contra *H. influenzae* tipo b reduziu sua incidência, e hoje faz parte do esquema de vacinação em órgãos públicos. Esta vacina é administrada em três doses para crianças menores de 12 anos, no segundo, quarto e sexto mês de vida ou em uma única dose no período de 12 a 24 meses. No Brasil, SIMÕES e colaboradores (2004) demonstraram que com a introdução da vacina houve uma redução em torno de 51% e 78%, no primeiro e segundo ano de vida, respectivamente. Esta redução foi mais pronunciada na faixa etária de sete a 23 meses, devido à maturidade do sistema imunológico.

Para *S.pneumoniae* existem disponíveis dois tipos de vacinas. A vacina conjugada heptavalente é composta por sete tipos de cápsulas (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), conjugados individualmente a uma variante não tóxica da toxina diftérica. Estes sorotipos pertencem aos microorganismos mais prevalentes em crianças entre seis meses e 2 anos, incluindo as cepas resistentes à penicilina.

A outra vacina é composta de polissacarídeos de 23 sorotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F) responsáveis por mais 90% das doenças invasivas nos E.U.A e em torno de 80% no Brasil (OSELKA *et al*, 2003). Esta vacina é recomendada para maiores de 2 anos de idade, sendo pouco imunogênica para crianças menores de 2 anos e pacientes imunocomprometidos.

Existem dois tipos de vacina contra *N. meningitidis*, sendo uma vacina bivalente para os sorogrupos A e C e esta indicada para crianças maiores de 2 anos de idade e confere proteção por 3 a 5 anos. A vacina meningocócica conjugada C protege contra o sorogrupo C que causa as formas mais graves da doença, é administrada a partir de 2 meses de vida e induz proteção de longa duração. Outra vacina é a tetravalente para os sorogrupos, A, C, Y e W135 (HARRISON *et al.*, 2006) administrada para maiores de 2 anos.

Assim, as meningites bacterianas constituem um problema relevante para a saúde pública, por ser uma doença contagiosa e causar epidemias (FEIGIN & PEARLAN, 1998). Seu estudo é fundamental, devido ao potencial epidêmico, altas taxas de morbidade e mortalidade, altos custos com tratamento e a frequência de seqüelas, que muitas vezes podem ser irreversíveis. Assim, o prognóstico do paciente depende do diagnóstico precoce e do início imediato do tratamento.

Quando o paciente apresenta sinais e sintomas sugestivos de meningite, o médico solicita a coleta do LCR para realizar o diagnóstico da doença. O LCR deve ser analisado imediatamente e esta análise inclui exames físicos, citológico, bioquímicos, microbiológicos e imunológicos.

O exame físico compreende a avaliação do aspecto e da coloração. O LCR normal apresenta-se como um fluido cristalino e límpido. O aspecto pode ser classificado como límpido, ligeiramente turvo ou turvo. A presença aumentada de leucócitos, hemácias, microorganismos, concentrações elevadas de proteínas ou lipídeos são suficientes para deixá-lo turvo. O LCR pode estar xantocrômico, cuja coloração pode ser rosa, laranja e amarela, geralmente causada pela lise dos

eritrócitos, mas pode ocorrer quando há níveis séricos elevados de bilirrubina, concentrações aumentada de proteínas, presença de caroteno e pigmento de melanoma, características que podem estar associadas com diversas patologias (WATSON & SCOTT, 1995).

A análise citológica consiste na avaliação da celularidade tanto em números absolutos como relativos. O LCR normal em crianças maiores de três meses e em adultos apresenta o número de leucócitos até $5 /\text{mm}^3$ (FARIA *et al.*, 1999). A contagem diferencial de leucócitos em adultos tem predomínio de linfócitos e monócitos, e ocasionalmente podem ser encontrados neutrófilos e eosinófilos (SEEHUSEN *et al.*, 2003). Em recém-nascidos podemos encontrar de 8 a 32 leucócitos $/\text{mm}^3$ e com predomínio de polimorfonucleares. O aumento polimorfonucleares no LCR pode ocorrer em doenças malignas, hemorragias intracranianas e uma variedade de processos inflamatórios. As meningites assépticas ou virais são caracterizadas pelo predomínio de células mononucleares no LCR e meningites bacterianas caracterizadas pelo predomínio de polimorfonucleares. Nas infecções iniciais por *Enterovirus* pode ocorrer um aumento de polimorfonucleares, o qual pode persistir ao longo da doença (BASHIR *et al.*, 2007). NEGRINI e colaboradores (2000) relatam o predomínio de polimorfonucleares em meningites virais, em torno de 50 a 90%, considerando este marcador inadequado para diferenciar meningite viral de bacteriana.

A análise bioquímica compreende a dosagem de glicose, lactato, cloreto e proteínas totais. A composição do LCR é 99% de água e sua osmolaridade é semelhante ao soro. Oitenta por cento das proteínas presentes no LCR são oriundas do soro e 20% produzidas intratecalmente (WATSON & SCOTT, 1995). A determinação da concentração de proteínas é um sensível indicador de patologia no SNC. O aumento de proteínas no LCR pode ocorrer em infecções, hemorragias intracranianas, esclerose múltipla, Síndrome de Guillain-Barré, tumores, algumas anormalidades hormonais, medicamentos e uma variedade de processos inflamatórios (SEEHUNSEN *et al.*, 2003).

Os níveis de glicose no LCR devem ser correlacionados com os níveis de glicose sanguínea, correspondendo a aproximadamente 70 a 80% do valor sanguíneo. A diminuição das taxas de glicose ocorre em meningites bacterianas, em condições inflamatórias, em hemorragia subaracnóidea e em hipoglicemia. A

vantagem desta determinação é que com o início da terapia os valores voltam ao normal, auxiliando no monitoramento do tratamento (WATSON & SCOTT, 1995)

A concentração aumentada de lactato pode estar associada com diversas patologias, mas muitos autores consideram este marcador mais sensível que a determinação de glicose e de proteína no auxílio do diagnóstico de meningite bacteriana. A concentração de lactato no LCR é dependente da glicólise e independente da concentração sangüínea (WATSON & SCOTT, 1995). E ao contrário da glicose, o lactato pode permanecer aumentado por longos períodos após o início do tratamento (TZENG & STEPHENS, 2000)

O cloreto pode estar diminuído em meningites purulentas ou tuberculosa (SEEHUNSEN *et al.*, 2003). Outro marcador que pode auxiliar no diagnóstico de meningite bacteriana é a dosagem de Proteína C Reativa (PCR), uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado geralmente em resposta a interleucina-6 (WATSON & SCOTT, 1995), produzida não somente em infecções, mas também em algumas inflamações (RAY *et al.*, 2007). Recentemente tem sido descrito, que a determinação dos níveis sangüíneos de procalcitonina apresenta alta precisão no diagnóstico diferencial de meningite bacteriana e viral (RAY *et al.*, 2007).

As análises imunológicas compreendem os testes de aglutinação do látex e contraímunoeletroforese. A aglutinação em látex permite a detecção rápida do antígeno bacteriano em LCR, onde micro-esferas de poliestireno de 0,2 a 1 μm de diâmetro são adsorvidas anticorpos específicos. A sensibilidade desta técnica é limitada, entretanto as suas vantagens são pela rapidez, fácil execução e permitir a detecção do agente mesmo com uso prévio de antibióticos (BASHIR *et al.*, 2003). Existem kits comerciais de aglutinação para identificação de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *E. coli* K1, *H. influenzae* tipo b e *S. agalactiae* (BASHIR *et al.*, 2003). A variação da sensibilidade e da especificidade depende da qualidade dos anticorpos utilizados. Resultados falso-negativo têm sido documentados devido à baixa concentração do microorganismo, erro técnico e fenômeno prozona, enquanto os resultados falso-positivo ocorrem devido à reação cruzada com outros microorganismos (RAY *et al.*, 1993). Este teste geralmente é realizado quando a coloração de Gram e cultura são negativas e há suspeita clínica (SEEHUNSEN *et al.*, 2003), mas seu resultado negativo não exclui meningite bacteriana.

O teste de contraímunoeletroforese é menos sensível que o teste de aglutinação em látex, mas é mais usual na detecção de antígeno quando a amostra

clínica apresenta altos níveis protéicos que podem levar a autoaglutinação e a resultados indeterminados. O custo alto dos antisoros, tempo longo de execução (30-45 min) e algumas vezes dificuldade de interpretação dos resultados levam a sua pouca utilização. Estes testes imunológicos apresentam boa sensibilidade somente quando a concentração microbiana está acima de 1.000 UFC/mL (KAPLAN, S.L, 1992).

A análise microbiológica inclui a pesquisa de bactérias pela coloração de Gram (bacterioscopia) e cultura. A coloração de Gram apresenta 60 a 80% de positividade nos casos de pacientes sem tratamento, pacientes com antibioticoterapia a positividade cai para 40 a 60%. A sensibilidade da microscopia pode ser questionável. A concentração bacteriana no LCR determina a sensibilidade do resultado da microscopia. A porcentagem de resultados positivos é de 25% quando a concentração está inferior a 1.000 UFC/mL, aumenta para 60% com 1.000 a 100.000 UFC/mL e para 97% com concentração maior do que 100.000 UFC/mL (LA SCOLEA & DRYJA, 1984). A vantagem da realização da bacterioscopia é que logo após a punção lombar, é possível informar ao clínico as características morfológicas e tintoriais do possível agente etiológico e auxiliar no início do tratamento.

A cultura é o método ouro no diagnóstico de meningite bacteriana, mas existem fatores limitantes na detecção como antibioticoterapia, presença de microorganismos fastidiosos e de crescimento lento. A sensibilidade deste método está em torno de 85% (FARIA *et al.*, 1999).

Outra análise microbiológica que pode auxiliar no diagnóstico das meningites bacterianas é a hemocultura. Existem trabalhos que relatam o aumento em torno de 13,6% no diagnóstico, quando a hemocultura é realizada juntamente com a coleta de LCR (LOPES & SANTOS, 2002).

Assim, as técnicas mais rápidas empregadas no diagnóstico de patógenos no LCR são a coloração de Gram e o teste de aglutinação em látex, respectivamente. Mas o diagnóstico definitivo somente é obtido com 24 a 48 horas após a finalização da cultura do LCR. Estes ensaios apresentam baixa sensibilidade para amostras com pequenas concentrações de microorganismos, presença de microorganismos fastidiosos e amostras de pacientes que fazem o uso de antibióticos durante a punção lombar. Ao mesmo tempo, apresentam problemas técnicos que podem afetar a sua sensibilidade como o tempo inadequado entre a coleta e o

processamento das amostras e a utilização de meios de cultura inadequados para o isolamento dos microorganismos.

O diagnóstico molecular tem sido desenvolvido com intuito sanar as deficiências dos métodos convencionais e com isso aumentar a sensibilidade da detecção das meningites. O método molecular detecta o DNA bacteriano em diferentes tipos de amostras clínicas, como no LCR. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um ensaio mais rápido, específico e sensível do que os métodos convencionais, e tem a vantagem de utilizar um menor volume de amostra e ser realizado em curto período.

Existe na literatura relatos de ensaios moleculares que são capazes de detectar diferentes bactérias em um único ensaio de PCR, método conhecido como MULTIPLEX-PCR. E essa reação baseia-se no uso de uma mistura de iniciadores específicos e cada par de iniciadores correspondendo a um gênero ou espécie bacteriana. (CORLESS *et al.*, 2001; UZUKA *et al.*, 2004; FAILACE *et al.*, 2005; TZANAKAKI *et al.*, 2005; VAN GASTEL *et al.*, 2007).

CORLESS e colaboradores (2001) desenvolveram um ensaio para detecção simultânea de *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* por PCR em tempo real, usando os iniciadores específicos para os genes *crtA*, *bexA*, *ply*, respectivamente.

FAILACE e colaboradores (2005) desenvolveram um ensaio de Semi-Nested MULTIPLEX-PCR para a detecção de *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* usando um iniciador universal para o gene *16S rDNA*, gerando um produto não específico, e uma segunda etapa que utiliza três iniciadores específicos, conseguindo distinguir os três gêneros.

TZANAKAKI e colaboradores (2005) desenvolveram um ensaio de MULTIPLEX-PCR para *N. meningitidis*, *H. influenzae* tipo b e *S. pneumoniae* usando os iniciadores *crtA*, *bex*, *ply*.

VAN GASTEL e colaboradores (2007) avaliaram o desempenho do ensaio da PCR por Tempo Real no diagnóstico de *N. meningitidis* e *S. pneumoniae*, usando iniciadores *crtA* e *ply*, comparando com os resultados de cultura microbiológica e bacterioscopia.

UZUKA e colaboradores (2004) descreveram um ensaio de multiplex-PCR e real time PCR para detecção de *H. influenzae* e *S.pneumoniae*, usando iniciadores universal e específico para o gene *23S rRNA*.

Contudo, apesar destes diversos trabalhos que fazem uso da ferramenta molecular no diagnóstico da etiologia da meningite, não existem relatos sobre a determinação simultânea das quatro espécies bacterianas mais frequentemente isoladas em meningites. No presente trabalho, desenvolvemos uma MULTIPLEX-PCR para a determinação simultânea das espécies bacterianas *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* e outro possível agente bacteriano através do uso do gene *16S rDNA*. Os genes selecionados para identificação destes microorganismos foram *p6*, *crtA* (CORLESS *et al.*, 2001), *fbsA*, *lytA* (MESSMER *et al.*, 1997), respectivamente.

Assim, esperamos que com este ensaio molecular, possamos auxiliar na identificação rápida e correta do agente etiológico, para que o paciente possa iniciar o tratamento adequado, evitando o aparecimento de seqüelas. E com isso, assessorar na correta notificação dos casos, permitindo melhor monitoramento da incidência dos agentes etiológicos e auxiliando a correta decisão pela Saúde Pública, tanto em relação à quimioprofilaxia como no uso das vacinas em surtos ou campanhas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho é diminuir o tempo da identificação de agentes bacterianos da meningite. Para tanto, este estudo visa padronizar um método molecular de detecção simultânea das espécies bacterianas mais prevalentes na meningite.

2.2 - Objetivos específicos

- Padronizar uma reação em cadeia da polimerase com múltiplos iniciadores (MULTIPLEX-PCR) para a determinação da etiologia bacteriana das meningites.
- Avaliar a sensibilidade do método molecular em relação à cultura do líquido cefalorraquidiano.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras de Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

As amostras de LCR foram obtidas no Hospital Universitário – USP (HU-USP) e Instituto de Infectologia Emilio Ribas (IIER), onde as análises bioquímicas, citológicas e microbiológicas foram previamente realizadas. Os dados destas análises foram utilizados para avaliação dos resultados moleculares. Foram analisadas 447 amostras, sendo 27 positivas e 420 negativas para cultura bacteriológica (**Tabela 1**).

As amostras foram divididas em grupos: Grupo I – amostra positiva para cultura; Grupo II – amostras negativas para cultura, mas com alguma alteração bioquímica, microbiológica (bacterioscopia), imunológica (aglutinação em látex) ou hematológica sugestiva de meningite bacteriana (número de leucócitos acima de 100 células/mm³, porcentagem de neutrófilos acima de 50%, glicose abaixo de 40 mg/dL, lactato acima de 40 mg/dL e proteína acima de 40 mg/dL), Grupo III – amostras negativas para cultura, coloração de Gram (Bacterioscopia) e aglutinação em látex, e sem alterações bioquímicas e hematológicas que pudessem sugerir um quadro de meningite bacteriana.

Tabela 1- Amostras de LCR obtidas nos Hospitais.

Resultados da Cultura	Número de Amostras HU-USP ^a	Número de Amostras IIER ^b	Total de Amostras
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	0	0
<i>Neisseria meningitidis</i>	11	0	11
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	12	1	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	1
Negativo	412	8	420
Total de amostras	438	9	447

^a HU-USP – Hospital Universitário da Universidade de São Paulo

^b IIER - Instituto de Infectologia Emilio Ribas

3.2. Espécies bacterianas e condições de cultivo

Neisseria meningitidis, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* foram cultivadas em ágar chocolate suplementado com fatores V e X (Oxoid). *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus* sp, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* foram cultivadas em ágar sangue (Oxoid). *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella* sp foram cultivadas em ágar MacConkey (Oxoid). As bactérias foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 18 a 24h. Após crescimento e sua utilização, as espécies bacterianas foram congeladas a - 80°C em caldo Hidrolisado de Soja (Oxoid) com 15% de glicerol para armazenamento.

Essas bactérias foram utilizadas para padronização, avaliação da sensibilidade e especificidade da MULTIPLEX-PCR.

3.3. Obtenção do DNA bacteriano para ensaio molecular e avaliação da sensibilidade do método

3.3.1. Amostras de Líquido cefalorraquidiano (LCR)

Os LCRs enviados pelos hospitais foram submetidos ao seguinte protocolo para sua utilização no ensaio molecular: aproximadamente 100µL de LCR foram aquecidos a 100°C por 15 minutos e logo em seguida, colocados em banho de gelo por 15 minutos. Esta amostra foi designada como “lisado” e mantida à -25°C até o momento de uso na reação da PCR.

3.3.2. Espécies bacterianas

Para verificar se haveria diferença de sensibilidade na detecção do DNA bacteriano por MULTIPLEX-PCR, foram utilizados dois métodos de obtenção de DNA bacteriano: lisado e DNA purificado por Kit comercial.

3.3.2.1. Lisado bacteriano

N. meningitidis, *H. influenzae*, *S. agalactiae* e *S. pneumoniae* foram ressuspensas em caldo Hidrolisado de Soja (Oxoid) e suas concentrações ajustadas em espectrofotômetro (λ 625 nm; Absorbância 0,08 - 0,10), de acordo com a escala 0.5 de MacFarland (correspondente a 10^8 UFC/mL). Foram utilizadas duas cepas diferentes para cada espécie. As amostras foram diluídas nas seguintes concentrações: 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 UFC/mL (**Figura 1**).

Uma alíquota de 2 μ L e 1 μ L de cada diluição foi semeada em ágar sangue ou chocolate, de acordo com as exigências nutricionais do microrganismo, para contagem de unidades formadoras de colônias. Outra alíquota de 2 μ L e 1 μ L de cada diluição foi transferida para um tubo contendo 6,1 μ L e 6,2 μ L, respectivamente, de água MilliQ-estéril e, em seguida, aquecidos a 100°C por 15 minutos e colocados após este período em banho de gelo por 15 minutos. Para as cepas Gram-positivas, o lisado bacteriano também foi preparado com lisostafina (Sigma Aldrich L-7386) nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 mg/mL ou lisozima (Sigma Aldrich L6876), nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 mg/mL, com a finalidade de avaliar um aumento na sensibilidade do método, pela ação destas enzimas na parede celular destes microrganismos.

Esse protocolo foi realizado com o objetivo de se determinar qual seria o menor número de unidades formadoras de colônias detectáveis por MULTIPLEX-PCR.

Figura 1- Desenho esquemático da diluição realizada para o ensaio de sensibilidade do método de MULTIPLEX-PCR em função do número de colônias. O ensaio foi realizado em duplicata.

Em paralelo, foi realizada a extração de DNA a partir de 1 mL de suspensão bacteriana com 10^8 UFC/mL, conforme item 3.3.2.2, com o objetivo de avaliar a concentração DNA em relação ao número de UFC. Este procedimento foi realizado em duplicata com as cepas de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus pneumoniae*.

3.3.2.2. Extração de DNA bacteriano

O DNA bacteriano de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus pneumoniae* foram extraídos pelo Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega, Madison-USA), de acordo com as especificações do fabricante. Os DNAs extraídos foram quantificados por NanoDrop ND, diluídos para 10, 5, 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ng/ μ L e utilizados como amostra.

Esse protocolo foi realizado com o objetivo de se determinar qual seria a menor concentração de DNA bacteriano detectável pelo método.

3.4. Avaliação da especificidade

As amostras de *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp, *Shigella* sp, *Citrobacter diversus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* e amostras positivas de LCR para *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* foram preparadas de acordo com item 3.3.1 e testadas na reação de MULTIPLEX-PCR de acordo item 3.6.

3.5. Desenho dos iniciadores

Os iniciadores específicos para o gene *crtA* de *N. meningitidis* e o gene *lytA* de *S. pneumoniae* foram obtidos da literatura (CORLESS *et al.*, 2001; MESSMER *et al.*, 1997). Para o gene 16S rDNA, o gene *p6* de *H.influenzae* e o gene *fbsA* de *S.agalactiae*, iniciadores específicos foram desenhados à partir de seqüências de DNA depositadas no Gene Bank. Os iniciadores empregados na MULTIPLEX-PCR estão listados na **Tabela 2**.

Tabela 2- Iniciadores empregados na reação de MULTIPLEX-PCR

Gene	Microorganismos	Sequências (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb) ^c	Referências
<i>p6</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	F ^a : ACGATGCTGCAGGCAATGGT R ^b : ATACTTTAGCAGCTGGCGTTGC	177	Este estudo
<i>crtA</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	F ^a : GCTGCGGTAGGTGGTTCAA R ^b : TTGTCGCGGATTTGCAACTA	110	CORLESS <i>et al.</i> , 2001
<i>fbxA</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	F ^a : AGAGCGTCGTCAACGTGATGC R ^b : AAGTCACCCTAACCAACCTAA	529	Este estudo
<i>lytA</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	F ^a : GGCTACTGGTACGTACATTC R ^b : AATCAAGCCATCTGGCTCTA	395	MESSMER <i>et al.</i> , 1997
16S <i>rDNA</i>	universal	F ^a : CAGCAGCCGCGGTAATAC R ^b : ACCAGGGTATCTAATCCTGT	283	Este estudo

^a F – Forward^b R – Reverse^c pb – pares de bases

A MULTIPLEX-PCR para os testes de sensibilidade foi realizada com duas cepas diferentes para cada espécie bacteriana. Para cada amostra de DNA, o ensaio foi realizado em duplicata, em dias diferentes. Para avaliar uma possível variação na sensibilidade do método, os iniciadores para o gene 16S *rDNA* foram retirados da reação, a MULTIPLEX-PCR passou a ter apenas um par de iniciadores para cada microrganismo a ser identificado.

3.6 Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para um volume final de 20 µL, utilizou-se 1X Solução tampão 10X; 1,5 mM de MgCl₂; 150 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 0,4 µM de cada iniciador, exceto 16S *rDNA*, cuja concentração utilizada foi de 0,2 µM; 1,5 unidade de *Taq* DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Lituânia), 2 µL de amostra (amostra clínica, lisado bacteriano ou DNA extraído) e água milliQ estéril para completar o volume final da reação. As amplificações foram realizadas no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf), sob as seguintes condições: um ciclo a 95 °C por 4 min; seguido de 40 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 60°C, 1,5 minutos a 72°C. A reação foi concluída com um ciclo a 72°C por 7 minutos. O produto da reação foi armazenado a -20°C para a posterior análise.

3.7. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1,2 % em tampão TBE 0,5x (Trisma-base 0,1M, ácido bórico 0,09M e EDTA 1mM), onde foram submetidos à separação eletroforética por cerca de 90 minutos a 9,5 V/cm. As amostras foram coradas com brometo de etídio (5 µg/mL) e visualizadas sob luz UV. A imagem fotográfica foi digitalizada pelo sistema *Photodocumentation System* Modelo: DP-001.FDC Versão 10 (*Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex 1 - França*).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Reação de MULTIPLEX-PCR

Para otimizar a identificação dos agentes bacterianos mais prevalentes na meningite, foi padronizada uma reação em cadeia da polimerase com múltiplos iniciadores (MULTIPLEX-PCR). Os microorganismos alvo do presente estudo foram *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae* e *S. pneumoniae*. Para a detecção molecular destas espécies bacterianas foram selecionados genes específicos (Tabela 2), bem como o gene *16S rDNA*, utilizado para a confirmação da presença de agentes bacterianos.

Pela MULTIPLEX-PCR foi possível amplificar eficientemente os genes *crtA* (*N. meningitidis*), *lytA* (*S. pneumoniae*), *p6* (*H. influenzae*), *fbsA* (*S. agalactiae*) e simultaneamente o gene *16S rDNA*, não ocorrendo a presença de produtos inespecíficos da reação (Figura 2). A presença de outros possíveis agentes bacterianos é sinalizada pela amplificação apenas do gene *16S rDNA*.

Figura 2 - MULTIPLEX-PCR para a determinação de agentes etiológicos da meningite bacteriana. As espécies bacterianas *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* foram utilizadas na MULTIPLEX-PCR para avaliar a especificidade da reação. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,2 % por 90 minutos a 9,5 V/cm. 1- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®), 2- *Streptococcus agalactiae* (*fbsA*, 529 pb e *16S rDNA*, 283 pb), 3- *Streptococcus pneumoniae* (*lytA*, 395 pb e *16S rDNA*, 283 pb), 4- *Neisseria meningitidis* (*crtA*, 110 pb e *16S rDNA*, 283 pb), 5- *Haemophilus influenzae* (*p6*, 177 pb e *16S rDNA*, 283 pb), 6 - *Escherichia coli* (*16S rDNA*, 283 pb), 7- *Listeria monocytogenes* (*16S rDNA*, 283 pb).

4.2. Avaliação da sensibilidade da MULTIPLEX-PCR para a detecção de DNA

A sensibilidade da MULTIPLEX-PCR foi avaliada através do uso de concentrações decrescentes de DNA extraído por Kit e lisado bacteriano na reação.

4.2.1. DNA bacteriano extraído por Kit

O DNA bacteriano de *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae* e *S. pneumoniae* foi extraído e processado conforme descrito nos Materiais e Métodos (itens 3.3.2.2, 3.6 e 3.7). Para todas as espécies bacterianas, a menor concentração de DNA detectada pela PCR foi de 1 pg/ μ L (Tabela 3). A MULTIPLEX-PCR também foi realizado sem os iniciadores para o gene 16S *rDNA* e observou-se a mesma sensibilidade na detecção dos agentes etiológicos (1 pg/ μ L).

Tabela 3- Sensibilidade da MULTIPLEX-PCR: DNA bacteriano extraído por Kit

Bactéria	Concentração mínima de DNA detectado na PCR
<i>H. influenzae</i>	1 pg/ μ L
<i>N. meningitidis</i>	1 pg/ μ L
<i>S. agalactiae</i>	1 pg/ μ L
<i>S. pneumoniae</i>	1 pg/ μ L

Na Figura 3 está ilustrada a corrida eletroforética do teste de sensibilidade da MULTIPLEX-PCR para *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae* e *S. pneumoniae*.

Figura 3- Teste de sensibilidade da MULTIPLEX-PCR realizado com diluições seriadas de DNA extraído por Kit. Diferentes diluições do DNA bacteriano foram testadas na reação de MULTIPLEX-PCR para avaliar a sensibilidade do método. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,2 % por 90 minutos a 9,5 V/cm. A figura ilustra o ensaio de *Haemophilus influenzae* (p6, 177 pb e 16S rDNA, 283pb), *Neisseria meningitidis* (crtA, 110 pb e 16S rDNA, 283 pb), *Streptococcus pneumoniae* (lytA, 395 pb e 16S rDNA, 283 pb) e *Streptococcus agalactiae* (fbsA, 529 pb e 16S rDNA, 283 pb). 1- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®), 2- 1000 pg/μL, 3- 500 pg/μL, 4- 100 pg/μL, 5 - 10 pg/μL, 6- 1 pg/μL, 7- 0,1 pg/μL.

4.2.2- Lisado bacteriano

O lisado das espécies bacterianas foi processado conforme descrito nos Materiais e Métodos (itens 3.2.2.1 e 3.6). O número teórico de UFC corresponde ao número de colônias que deveriam crescer no plaqueamento e o número real corresponde ao número colônias crescidas na placa de cultura. O número teórico de UFC para a detecção de *N. meningitidis* e *H. influenzae* correspondeu a 200 UFC para ambos os microrganismos e para *S. agalactiae* e *S. pneumoniae* correspondeu a 2.000 e 1.000 UFC, respectivamente, conforme **Tabela 4** e **Figura 4 e 5**. O número real de UFC para a detecção de *N. meningitidis* e *H. influenzae* (34 e 26 UFC, respectivamente) foi menor do que o encontrado para *S. agalactiae* e *S. pneumoniae* (1870 e 1230 UFC, respectivamente) conforme **Tabela 4** e **Figura 4 e 5**. Para as cepas Gram-positivas, o lisado bacteriano também foi preparado com lisostafina e lisozima, onde não houve a amplificação de produto de PCR. *S. pneumoniae* foi

detectado em todas as amostras clínicas com cultura positiva e em três amostras com cultura negativa; *S. agalactiae* foi detectado em uma das amostras com cultura negativa. Esses resultados mostram que a MULTIPLEX-PCR proposta neste trabalho é sensível na detecção tanto de bactérias Gram-negativas quanto de Gram-positivas.

Em paralelo, foi realizada a quantificação do DNA por kit comercial (conforme item 3.3.2.2) em 10^8 UFC/mL, para avaliar a quantidade de DNA presente no número de unidades formadoras de colônias detectadas pela MULTIPLEX-PCR. Este procedimento foi realizado para cada microorganismo com o objetivo de avaliar a sensibilidade do “lisado bacteriano” em função da concentração de DNA. Os resultados demonstraram que a amostra preparada pela técnica de fervura e resfriamento apresentou maior sensibilidade que o método de extração por kit para todos os microorganismos testados, tanto em relação ao número real quanto ao teórico de unidades formadoras de colônias, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Sensibilidade da MULTIPLEX-PCR: Unidades Formadoras de Colônias (UFC) presentes no lisado bacteriano.

	Nº de UFC por reação Valor Teórico	Concentração de DNA nas UFC por reação Valor Teórico	Nº de UFC contadas em meio de cultura Valor Real	Concentração de DNA nas UFC por reação Valor Real
<i>H. influenzae</i>	200	0,01 pg/ μ L	26 $\pm$ 8	0,001 pg/ μ L
<i>N. meningitidis</i>	200	0,02 pg/ μ L	34 $\pm$ 16	0,003 pg/ μ L
<i>S. pneumoniae</i>	1000	0,20 pg/ μ L	1870 $\pm$ 390	0,17 pg/ μ L
<i>S. agalactiae</i>	2000	0,10 pg/ μ L	2775 $\pm$ 400	0,20 pg/ μ L

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

Figura 4 - Teste de sensibilidade da MULTIPLEX-PCR realizado com diluições seriadas de lisado bacteriano. Diferentes diluições do lisado bacteriano foram testadas na reação de MULTIPLEX-PCR para avaliar a sensibilidade do método. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,2 % por 90 minutos a 95 V/cm. A figura ilustra o ensaio de *Neisseria meningitidis* (*crtA*, 110 pb e *16S rDNA*, 283 pb) e *Haemophilus influenzae* (*p6*, 177 pb e *16S rDNA*, 283pb). 1- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®), 2 – 20.000 UFC /reação, 3 – 2.000 UFC /reação, 4 - 200 UFC/reação e 20 UFC/reação.

Figura 5 - Teste de sensibilidade da MULTIPLEX-PCR realizado com diluições seriadas de lisado bacteriano. Diferentes diluições do lisado bacteriano foram testadas na reação de MULTIPLEX-PCR para avaliar a sensibilidade do método. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,2 % por 90 minutos a 95 V/cm. A figura 5A ilustra o ensaio de *Streptococcus agalactiae* (*fbxA*, 529 pb e *16S rDNA*, 283 pb). 1- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®), 2 – 20.000 UFC /reação, 3 – 2.000 UFC /reação, 4 – 1.000 UFC./reação e a figura 5B ilustra o ensaio de *Streptococcus pneumoniae* (*lytA*, 395 pb e *16S rDNA*, 283 pb) 1- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®), 2 – 20.000 UFC /reação, 3 – 2.000 UFC /reação, 4 – 1.000 UFC./reação e 200 UFC/reação

4.3 - Avaliação da especificidade do MULTIPLEX-PCR

Os lisados das cepas de *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus* sp, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Salmonella sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* sp, *Citrobacter diversus*, *Listeria monocytogenes*, amostra clínica com *Cryptococcus neoformans* e com *Candida albicans* foram processados conforme descrito nos Materiais e Métodos (itens 3.3.1 e 3.6). Para estes microorganismos não foram observados produtos de amplificação com mesmo número de pares de base que os produzidos pelos genes *lytA*, *crtA*, *fbsA* e *p6*, que são pesquisados pela MULTIPLEX-PCR deste trabalho. No caso das bactérias, o único gene amplificado foi *16S rDNA*, conforme **Figura 5**. Assim, não foram observadas reações cruzadas, demonstrando a alta especificidade do método.

Figura 6 - MULTIPLEX-PCR realizado com diferentes microorganismos. Lisados de diferentes gêneros bacterianas e amostras clínicas positivas para *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* foram testadas na reação de MULTIPLEX-PCR para avaliar as possíveis bandas amplificadas. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,2 % por 90 minutos a 9,5 V/cm.

1- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®), 2- *Enterococcus* sp, 3- *Streptococcus pyogenes*, 4- *Cryptococcus neoformans*, 5- *Candida albicans*, 6- *Staphylococcus aureus*, 7- *Escherichia coli*, 8- *Salmonella* sp, 9- *Pseudomonas aeruginosa*, 10- *Shigella* sp, 11- *Listeria monocytogenes*, 12- *Streptococcus agalactiae*, 13- *Klebsiella pneumoniae*, 14- *Citrobacter diversus*, 15- *Neisseria gonorrhoeae*, 16- *Neisseria meningitidis*, 17- *Streptococcus agalactiae*, 18- *Haemophilus influenzae*, 19- *Streptococcus pneumoniae*, 20- padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®).

4.4. Aplicação da MULTIPLEX-PCR em amostras de LCR para detecção de agentes bacterianos

As 447 amostras de LCR foram divididas em três grupos (Grupo I, II e III), de acordo com os diferentes parâmetros laboratoriais. Grupo I – amostra positiva para cultura; Grupo II – amostras negativas para cultura, mas com alguma alteração bioquímica, microbiológica (bacterioscopia), imunológica (aglutinação em látex) e/ou hematológica sugestiva de meningite bacteriana (coloração de Gram-positiva, aglutinação de látex positiva, número de leucócitos acima de 100 células/mm³, porcentagem de neutrófilos maior que 50%, glicose abaixo de 40 mg/dL, lactato e proteínas acima de 40 mg/dL), Grupo III – amostras negativas para cultura, coloração de Gram (Bacterioscopia) e aglutinação em látex, e sem alterações bioquímicas e/ou hematológicas que pudessem sugerir um quadro de meningite bacteriana. Na **Tabela 5** estão descritos os resultados da cultura bacteriana e dos ensaios moleculares para bactérias e vírus, em função dos Grupos I, II e III.

Em paralelo, o grupo da Profa Charlotte Marianna Hársi (Instituto de Ciências Biomédicas- Universidade de São Paulo) pesquisou a presença de vírus em 158 dessas amostras de LCR (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Resultados dos ensaios moleculares (bactérias e vírus), em relação aos Grupos I, II e III e a cultura bacteriana:

Grupos	Cultura Bacteriana	PCR				
		Bactéria		Vírus		
		Positivo	Negativo	Herpes*	Enterovírus*	Negativo
G I	27	27	0	0	0	0
G II	0	13	376	7	33	116
G III	0	0	31	0	2	0
Total	27	40	407	7	35	116
Número total de amostra		447		158		

¹ Grupo I – amostras positivas para cultura.

² Grupo II – amostras negativas para cultura, mas com alguma alteração bioquímica, microbiológica (bacterioscopia) e hematológica sugestivas de meningite bacteriana.

³ Grupo III – amostras negativas para cultura, coloração de Gram e sem alterações bioquímicas e hematológicas que pudessem sugerir uma meningite bacteriana.

* Resultados fornecidos pelo Grupo de Pesquisa da Profa Charlotte Marianna Hársi (ICB-USP).

4.4.1. Amostras de LCR positivas para cultura e MULTIPLEX-PCR

Dentre os 447 LCRs avaliados, apenas 6,0 % foram positivos para cultura bacteriológica, o que corresponde a 27 amostras, conforme **Tabela 6**. Dentre estas, foram isolados 48 % de *S. pneumoniae*, 41 % de *N. meningitidis*, 7 % de *P. aeruginosa* e 4 % de *K. pneumoniae*. Os resultados citológicos, imunológicos e bioquímicos destas amostras apresentaram alterações compatíveis com quadro laboratorial de meningite bacteriana.

Nas amostras com cultura bacteriológica positiva (Grupo I), a MULTIPLEX-PCR detectou a presença de todos os agentes etiológicos e os resultados foram compatíveis com os microorganismos isolados na cultura (**Tabela 6**). Nas amostras onde foram encontradas as espécies bacterianas *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, somente o gene *16S rDNA* foi amplificado (**Tabela 6**).

Na **Tabela 6** estão os resultados comparativos da cultura bacteriológica com a MULTIPLEX-PCR em relação aos grupos e microorganismos isolados. Estes dados ressaltam a sensibilidade e especificidade do método molecular, pois a MULTIPLEX-PCR permitiu a correta detecção dos agentes etiológicos identificados pela cultura bacteriana. As amostras do Grupo III, com parâmetros normais, foram negativas para o ensaio de MULTIPLEX-PCR (**Tabela 5 e 6**).

Tabela 6 - Resultados comparativos do ensaio molecular (para bactérias) com a Cultura Bacteriológica, em relação aos Grupos I, II e III:

Grupos	Cultura Bacteriana	MULTIPLEX-PCR	Número de Amostras
G I	<i>N.meningitidis</i>	<i>N.meningitidis</i>	11
	<i>S.pneumoniae</i>	<i>S.pneumoniae</i>	13
	<i>K.pneumoniae</i>	<i>16S rDNA</i>	1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>16S rDNA</i>	2
	G I Total		27
G II	Negativa	Negativo	376
	Negativa	<i>N.meningitidis</i>	3
	Negativa	<i>S.agalactiae</i>	1
	Negativa	<i>S.pneumoniae</i>	3
	Negativa	<i>16S rDNA</i>	6
G II Total			389
G III	Negativa	Negativa	31
G III Total			31
Total			447

^a Grupo I – amostras positivas para cultura.

^b Grupo II – amostras negativas para cultura, mas com alguma(s) alteração (ões) bioquímica (s), microbiológica (bacterioscopia) e hematológica (s) sugestivas de meningite bacteriana.

^c Grupo III – amostras negativas para cultura, coloração de Gram e sem alterações bioquímicas e hematológicas que pudessem sugerir uma meningite bacteriana.

4.4.2. Amostras de LCR negativas para cultura e positivas para MULTIPLEX-PCR

A MULTIPLEX-PCR além de detectar as amostras positivas do Grupo I, detectou 13 amostras que apresentaram algum tipo de alteração celular, bioquímica, imunológica e/ou microbiológica (bacterioscopia), classificadas no Grupo II.

Dentre as 420 amostras com cultura de LCR negativa, 13 foram positivas para a reação de MULTIPLEX-PCR, o que proporcionou um aumento em torno de 50 % na detecção de meningite bacteriana, em relação às amostras positivas. O método convencional (cultura bacteriológica) identificou 27 amostras e o ensaio molecular 40 amostras. Na **Tabela 7**, estão listados os dados clínicos e laboratórios destes 13 pacientes com cultura negativa e MULTIPLEX-PCR positivo.

Em três amostras com cultura de LCR negativa, os genes *crtA* e *16S rDNA* foram amplificados, o que demonstrou a presença do DNA bacteriano de *N. meningitidis*. Os resultados citológicos e bioquímicos destes LCRs e o quadro clínico dos pacientes foram sugestivos de meningite bacteriana. Em um dos casos, o LCR foi obtido de um paciente que realizava controle de um recente diagnóstico de meningite meningocócica, ou seja, sob antibioticoterapia. Em outro caso, o paciente deu entrada no HU já sob ação de amoxicilina, uma vez que a mãe da criança suspeitava de sinusite. No terceiro caso, o padrasto da criança foi diagnosticado com meningite meningocócica. O padrasto e a criança foram a óbito. A hemocultura desta criança foi positiva para *N. meningitidis*.

Outro microorganismo que foi detectado em três amostras de LCR pelo método molecular foi *S. pneumoniae*, onde os genes *lytA* e *16S rDNA* foram amplificados pela MULTIPLEX-PCR. O LCR de um dos pacientes apresentava celularidade aumentada (45.696 células/mm³), com predomínio de polimorfonucleares (98%), concentrações de glicose baixa (3 mg/dL), de lactato aumentada (118,4 mg/dL) e de proteínas aumentadas (700 mg/dL), quadro clínico sugestivo de meningite bacteriana. O outro paciente, uma criança, apresentava hemocultura positiva para *S. pneumoniae* e bacterioscopia do LCR com a presença de cocos Gram-positivos, com celularidade aumentada

(17.600 células/mm³), com predomínio de polimorfonucleares (90%), concentrações de glicose normal (70 mg/dL), de lactato aumentada (48,7 mg/dL) e de proteínas aumentadas (130,1 mg/dL). O terceiro caso é uma criança com suspeita de meningite, com resultados negativos para cultura e coloração de Gram. Este paciente apresentou o teste de aglutinação em látex positivo para *S. pneumoniae*, celularidade aumentada (264 células/mm³), com predomínio de polimorfonucleares (89%), concentrações de glicose baixa (1 mg/dL), de lactato aumentado (107,7 mg/dL) e de proteínas aumentadas (171 mg/dL), estes dados tanto imunológico como bioquímicos são sugestivo de meningite bacteriana.

No LCR de um recém-nascido com suspeita clínica de sepse por *S. agalactiae*, observou-se a amplificação dos genes *fbsA* e *16S rDNA* pela MULTIPLEX-PCR. A criança não se encontrava sob antibioticoterapia e a cultura da secreção vaginal e retal da mãe tinha um resultado negativo. Esses dados sugerem a baixa concentração do microorganismo tanto na mãe quanto na criança, o que dificultou a detecção da bactéria pelo método convencional. Esses resultados destacam a sensibilidade do método molecular na detecção de DNA bacteriano.

Duas amostras de LCR foram positivas para o gene *16S rDNA*, e ambas foram coletas após antibioticoterapia. A cultura inicial foi positiva para *Acinetobacter baumannii*. Para confirmar o resultado da PCR foram utilizados os iniciadores descritos por Turton e colaboradores (2006), que identificam o gene *bla_{oxa-51-like}*, (codifica uma carbapenemase) encontrado somente nesta espécie de *Acinetobacter* sp.

Quatro amostras de LCR, positivas na reação de PCR para o gene *16S rDNA*, apresentaram alterações na celularidade e/ou na concentração protéica. Estes dados auxiliaram positivamente na avaliação dos resultados da MULTIPLEX-PCR, uma vez que, pacientes com celularidade aumentada os médicos iniciam a antibioticoterapia, mesmo sem o isolamento do agente etiológico. Não foi possível realizar o seqüenciamento do DNA do produto da PCR devido à baixa concentração de DNA bacteriano.

Tabela 7 - Dada clínicos e laboratorial dos 13 pacientes com cultura negativa e MULTIPLEX-PCR positivo:

Identificação	Idade Sexo	Suspeita Clínica	Tratamento Prévio	Resultados do LCR e outros exames	Resultado do MULTIPLEX-PCR
P1	3 anos Masculino	Meningite Meningocócica	Ceftriaxone (1dia)	Células: 5.600 /mm ³ , Hemácias: 100 /mm ³ , 1% de linfócitos, 3% de monócitos, 96% de neutrófilos, Glicose: 71 mg/dL, Lactato: 25 mg/dL, Proteína: 26,7 mg/dL e Cloreto: 132 mEq/L	Gene <i>crtA</i> e 16S rDNA (<i>N. meningitidis</i>)
P2	17 anos Masculino	Não consta	Amoxicilina (1dia)	Células: 5.330 /mm ³ , Hemácias: 190 /mm ³ , 4% de linfócitos, 18% de monócitos, 78% de neutrófilos, Glicose: 0 mg/dL, Lactato: 23,1 mg/dL, Proteína 83 mg/dL e Cloreto 123 mEq/L	Gene <i>crtA</i> e 16S rDNA (<i>N. meningitidis</i>)
P3	9 anos Feminino	Meningite Meningocócica	Não	Células: 395 /mm ³ , Hemácias: 32 /mm ³ , 1% de linfócitos, 99% de neutrófilos, Glicose: 19 mg/dL, Lactato: 174,7 mg/dL, Proteína 473,2 mg/dL e Cloreto 120 mEq/L	Gene <i>crtA</i> e 16S rDNA (<i>N. meningitidis</i>)
P4	69 anos Feminino	Sem dados	Sem dados	Células: 45.696/mm ³ , 98% de neutrófilos, Glicose: 3 mg/dL, Lactato: 118,4 mg/dL e Cloreto: 120 mEq/L	Gene <i>lytA</i> e 16S rDNA (<i>S.pneumoniae</i>)
P5	7 meses Feminino	Sem dados	Sem dados	Células: 17.600/mm ³ predomínio de neutrófilos, Gram presença de cocos gram positivos e Hemocultura: positiva para <i>S. pneumoniae</i> .	Gene <i>lytA</i> e 16S rDNA (<i>S.pneumoniae</i>)
P6	1 ano Masculino	Meningite bacteriana	Não	Células: 364 /mm ³ , Hemácias: 29 /mm ³ , 5% de linfócitos, 6% de monócitos, 89% de neutrófilos, Glicose: 1 mg/dL, Lactato: 107,7 mg/dL, Proteína 171 mg/dL e Cloreto 117 mEq/L	Gene <i>lytA</i> e 16S rDNA (<i>S.pneumoniae</i>)
P7	Recém-nascido Masculino	Sepse	Não	Células: 64 /mm ³ , 13% de linfócitos, 80% de monócitos, 7% de neutrófilos, Glicose: 106 mg/dL, Lactato: 23,5 mg/dL e Cloreto: 116 mEq/L	Gene <i>ftsA</i> e 16S rDNA (<i>S.agalactiae</i>)
P8	Recém-nascido Feminino	Mecônio (4 cruzes) Hipotônica e com cianose central	Não	Células: 10 /mm ³ , Hemácias: 940 /mm ³ , 68% de monócitos, 6% de linfócito, 26% de neutrófilos, Proteína: 58,4 mg/dL, Glicose: 61 mg/dL, Lactato: 24,4 mg/dL e Cloreto: 122 mEq/L	16S rDNA
P9	10 dias Masculino	Suspeita de Seps Tosse, febre de 38°C IVAS	Não	Células: 980 /mm ³ , Hemácias: 22.720 /mm ³ , 6% de monócitos, 14% de linfócito, 74% de neutrófilos, Proteína: 318 mg/dL e Glicose: 57 mg/dL, Lactato: 21 mg/dL e Cloreto: 114 mEq/L	16S rDNA
P10	36 anos Masculino	Meningite crônica ou doença de Behcet	Não	Células: 134 /mm ³ , Hemácias: 31 /mm ³ , 5% de monócitos, 29% de linfócito, 66% de neutrófilos, Proteína: 133,7 mg/dL, Glicose: 46 mg/dL, Lactato: 17,4 mg/dL e Cloreto: 130 mEq/L	16S rDNA
P11	26 anos Masculino	Broncodisplasia e hemorragia intracraniana	Não	Células: 9 /mm ³ , Hemácias: 1 /mm ³ , 4% de neutrófilo, 23% de linfócito, 73% de monócitos, Proteína: 58,1 mg/dL, Glicose: 56 mg/dL, Lactato: 10,9 mg/dL e Cloreto: 123 mEq/L	16S rDNA
P12	32 anos Masculino	Meningite bacteriana	Sim	Células: 130/mm ³ , Hemácias: 3 /mm ³ , Glicose: 76 mg/dL, Proteína: 32 mg/dL Lactato: 20 mg/dL e Cloreto: 127 mEq/L	16S rDNA <i>Acinetobacter baumannii</i>
P13	32 anos Masculino	Meningite bacteriana	Sim	Células: 101/mm ³ , Hemácias: 3 /mm ³ , Glicose: 73 mg/dL, Proteína: 25 mg/dL Lactato: 18 mg/dL e Cloreto: 118 mEq/L	16S rDNA <i>Acinetobacter baumannii</i>

Os resultados das análises bioquímicas, hematológicas e microbiológicas (bacterioscopia) foram avaliados e comparados aos resultados moleculares (Tabelas 8-13). Pode-se observar uma maior associação dos resultados da celularidade, porcentagem de neutrófilos, determinação de glicose e proteínas com os resultados moleculares (Tabela 8-13). Das treze amostras positivas para a MULTIPLEX-PCR com cultura negativa, dez

apresentaram proteína acima de 40 mg/dL (**Tabela 11**) e as amostras com valores dentro da normalidade eram pacientes que estavam fazendo uso de antibióticos (P1, P12 e P13, conforme **Tabela 7**), possivelmente estes valores estavam normais devido ao início do tratamento. Dessas treze amostras, dez apresentaram o número de células acima de 100 células/mm³ e três amostras com valores inferiores (**Tabela 8**). Estas três amostras correspondem aos pacientes P7, P8 e P11 (**Tabela 7**), que apresentavam no LCR um aumento do nível de proteínas. Em relação à porcentagem de polimorfonucleares, sete amostras apresentaram mais de 50% de neutrófilos e seis amostras menos de 50% (**Tabela 9**). Quatro destas seis amostras apresentavam altas concentrações de proteínas e as outras duas celularidade aumentada.

Conforme **Tabela 10**, nove amostras apresentaram concentração de glicose inferior a 40 mg/dL, sugerindo um quadro de meningite bacteriana e quatro amostras com valores acima de 40 mg/dL. Em três destas quatro amostras, no momento da punção os pacientes já estavam fazendo uso de antibióticos, demonstrando a importância do acompanhamento deste marcador durante o tratamento, pois com o início da terapia estes valores voltam ao normal (WATSON & SCOTT, 1995). Assim, esses resultados de concentração normal de glicose podem ser justificados pela terapia antimicrobiana e ressaltam a importância do método molecular, pois apesar da glicemia estar dentro dos limites normais foi possível detectar o agente etiológico na amostra clínica.

Os outros parâmetros (coloração de Gram e determinação de lactato) apresentaram menores correlações com a MULTIPLEX-PCR positiva. A coloração de Gram foi positiva somente em uma amostra do Grupo II, confirmando a baixa sensibilidade deste método. A detecção se dá quando a concentração do microorganismo está acima de 10⁵ UFC/mL (LA SCOLEA & DRYJA, 1984) (**Tabela 13**). A determinação de lactato não teve boa correlação com os resultados moleculares, somente quatro amostras apresentaram resultados acima do valor de referência, como é de se esperar em um quadro de meningite (**Tabela 12**).

Tabela 8 - Resultados comparativos dos ensaios moleculares (bactérias e vírus) com o número de células presentes no LCR, em relação aos Grupos I, II e III:

Grupos	Número de Células	Cultura Bacteriana	PCR				Total
			Enterovírus*	Herpes*	Negativo	Bactéria	
G I	Maior 100 células/mm ³	21				21	21
	Menor 100 células/mm ³	6				6	6
G I Total		27				27	27
G II	Maior 100 células/mm ³		11	1	85	10	106
	Menor 100 células/mm ³		20	6	211	3	241
	Não consta		2		40		42
G II Total			33	7	336	13	389
G III	Menor 100 células/mm ³		2		29		31
G III Total			2		29		31
Total			35	7	365	40	447

* Resultados fornecidos pelo Grupo de Pesquisa da Profa. Charlotte Marianna Hâris (ICB-USP).

Tabela 9 - Resultados comparativos dos ensaios moleculares (bactérias e vírus) com o número de neutrófilos presentes no LCR, em relação aos Grupos I, II e III:

Grupos	Neutrófilos	Cultura Bacteriana	PCR				Total
			Enterovírus*	Herpes*	Negativo	Bactéria	
G I	Acima de 50%	22				22	22
	Menor ou igual a 50%	2				2	2
	Não realizado	3				3	3
G I Total						27	27
G II	Acima de 50%	0	7	60	3	7	77
	Menor ou igual a 50%	0	17	178	1	6	200
	Não realizado	0	9	98	3		112
G II Total			33	336	7	13	389
G III	Acima de 50%	0		7			7
	Menor ou igual a 50%	0		12			12
	Não realizado	0	2	10			12
G III Total			2	29			31
Total		27	35	365	7	40	447

* Resultados fornecidos pelo Grupo de Pesquisa da Profa. Charlotte Marianna Hâris (ICB-USP).

Tabela 10 - Resultados comparativos dos ensaios moleculares (bactérias e vírus) com a determinação de glicose do LCR, em relação aos Grupos I, II e III:

Grupos	Glicose	Cultura Bacteriana	PCR				Total
			Enterovírus*	Herpes*	Negativo	Bactéria	
G I	Menor 40 mg/dL	24				24	24
	Maior 40 mg/dL	3				3	3
G I Total		27				27	27
G II	Menor 40 mg/dL		24	6	240	9	278
	Maior 40 mg/dL		6	1	53	4	63
	Não realizado		3		43		48
G II Total			33	7	336	13	389
G III	Maior 40 mg/dL		2		29		31
G III Total			2		29		31
Total		27	35	7	365	40	447

* Resultados fornecidos pelo Grupo de Pesquisa da Profa. Charlotte Marianna Hâris (ICB-USP).

Tabela 11 - Resultados comparativos dos ensaios moleculares (bactérias e vírus) com a determinação de proteínas do LCR, em relação aos Grupos I, II e III:

Grupos	Proteína	Cultura Bacteriana	PCR				Total
			Enterovírus*	Herpes*	Negativo	Bactéria	
G I	Maior 40 mg/dL	26				26	26
	Menor 40 mg/dL	1				1	1
G I Total		27				27	27
G II	Maior 40 mg/dL	0	16	5	223	10	254
	Menor 40 mg/dL	0	14	2	70	3	87
	Não realizado	0	3		43		48
G II Total			33	7	336	13	389
G III	Menor 40 mg/dL	0	2		29		31
G III Total			2		29		31
Total		27	35	7	365	40	447

* Resultados fornecidos pelo Grupo de Pesquisa da Profa. Charlotte Marianna Hâris (ICB-USP).

Tabela 12 - Resultados comparativos dos ensaios moleculares (bactérias e vírus) com a determinação de lactato, em relação aos Grupos I, II e III:

Grupos	Lactato	Cultura Bacteriana	PCR				Total
			Enterovírus*	Herpes*	Negativo	Bactéria	
G I	Maior 40 mg/dL	21				21	21
	Menor 40 mg/dL	4				4	4
	Não realizado	2				2	2
G I Total		27				27	27
G II	Maior 40 mg/dL		2		30	4	36
	Menor 40 mg/dL		21	7	263	9	298
	Não realizado		10		43		55
G II Total			33	7	336	13	389
G III	Menor 40 mg/dL		2		29		31
G III Total			2		29		31
Total		27	35	7	365	40	447

* Resultados fornecidos pelo Grupo de Pesquisa da Profa. Charlotte Marianna Hâris (ICB-USP).

Tabela 13 - Resultados comparativos dos ensaios moleculares (bactérias e vírus) com a Coloração de Gram, em relação aos Grupos I, II e III:

Grupos	Coloração de Gram	Cultura Bacteriana	PCR				Total
			Enterovírus*	Herpes*	Negativo	Bactéria	
G I	Negativa	3				3	3
	Positiva	24				24	24
G I Total		27				27	27
G II	Negativa		21	4	209	8	242
	Não realizada		12	3	127	4	146
	Positiva					1	1
G II Total			33	7	336	13	389
G III	Negativa		1		16		17
	Não realizada		1		13		14
G III Total			2		29		31
Total		27	35	7	365	40	447

* Resultados fornecidos pelo Grupo de Pesquisa da Profa. Charlotte Marianna Hâris (ICB-USP).

Os resultados obtidos sugerem que o MULTIPLEX-PCR proposto pode confirmar a suspeita clínica surgida a partir destes marcadores isolados ou associados, que auxiliam na definição do quadro de meningite bacteriana. Este dado pode facilitar a difícil decisão da medicação empírica a ser ministrada.

Os resultados do presente trabalho sinalizam que a reação de MULTIPLEX-PCR proposta possui sensibilidade e especificidade superior aos marcadores indiretos ou mesmo da cultura na detecção da etiologia das meningites bacterianas.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A meningite bacteriana é uma infecção séria e muitas vezes fatal que acomete o SNC. A cultura microbiológica, a coloração de Gram e os testes de aglutinação em látex têm sido utilizados rotineiramente na detecção e na identificação de bactérias em LCR. O diagnóstico definitivo de meningite bacteriana somente é obtido após a conclusão da cultura, em torno de 48 horas. Esperar o resultado conclusivo da cultura bacteriológica para o início do tratamento é inviável, uma vez que pacientes não tratados podem desenvolver sérias complicações clínicas (TZANAKAKI *et al.*, 2005).

A partir dos resultados da anamnese, da coloração de Gram, das análises citológica, imunológica e bioquímica do LCR, o tratamento é iniciado para garantir a sobrevivência do paciente e evitar o aparecimento de seqüelas. Contudo, em 30 a 40% das amostras de LCR, a coloração de Gram é negativa, não demonstrando a presença de bactérias (RAY *et al.*, 2007). As alterações celulares e bioquímicas do LCR, apesar de sugerirem um quadro clínico de meningite, podem estar relacionadas a outras patologias (SEEHUSEN *et al.*, 2003). Os testes imunológicos também podem ser negativos, em função do efeito prozona, da qualidade dos anticorpos utilizados e da quantidade de bactérias presentes no LCR, o que dificulta a decisão do médico em iniciar o tratamento. Assim, a sensibilidade destas análises é afetada por diversos fatores como limiar de detecção, a qualidade da amostra (relacionada com a coleta, transporte e armazenamento), quantidade de microorganismos presentes e pacientes com uso de antibióticos. Nos últimos anos, tem sido observado um aumento indiscriminado do uso de antibióticos antes da punção lombar, diminuindo em torno de 30% a identificação do agente etiológico (CORLESS *et al.*, 2001). E mesmo a cultura, que é o método ouro no diagnóstico das meningites bacterianas possui sensibilidade em torno de 85%, em paciente sem uso de antibióticos (FARIA *et al.*, 1999) e 60 a 70% em pacientes com uso de antibióticos.

A técnica molecular consegue sanar muitos destes problemas pela sua maior sensibilidade, pois detectam um menor número de bactérias na amostra clínica, não requerem a viabilidade do microorganismo (tempos longos para processamento e armazenamento incorreto das amostras podem afetar a viabilidade do

microorganismo), conseguem detectar o agente mesmo que o paciente esteja fazendo o uso de antibióticos e possibilitam um resultado rápido em no máximo seis horas após a punção lombar (FAILACE *et al.*, 2005).

O MULTIPLEX-PCR proposto neste trabalho combina cinco diferentes iniciadores que detectam simultaneamente o gene *crtA* de *N. meningitidis*, o gene *p6* de *H. influenzae*, o gene *fbxA* de *S. agalactiae*, o gene *lytA* de *S. pneumoniae* e o gene universal *16S rDNA* que detecta a presença de qualquer agente bacteriano. Não há relatos na literatura da existência de uma técnica molecular que combine a detecção destes quatro agentes etiológicos, bem como a detecção de outros agentes bacterianos, o que é possível pela presença de iniciadores para a detecção do gene *16S rDNA*.

O gene selecionado para identificação de *H. influenzae* codifica uma proteína de membrana externa P6 (OMP P6), designado de *p6*, encontrada em todos os sorotipos capsulados e não capsulados (BILLAL *et al.*, 2007). Nelson e colaboradores (1991) relataram que a proteína OMP P6 é altamente conservada entre três cepas geograficamente não relacionadas, e alguns autores utilizam este gene na identificação de *H. influenzae* (VAN KETEL *et al.*, 1990; HOTOMI *et al.*, 1993; UYAMA *et al.*, 1995). Devido a estas características, o gene *p6* foi escolhido para a detecção de *H. influenzae*, e os iniciadores empregados foram desenhados a partir da sequência de DNA obtida no GeneBank.

Na literatura há relatos da utilização da região *cap* para a detecção e tipagem de *H. influenzae* (VAN KETEL *et al.*, 1990; HASSAN KING *et al.*, 1998; HENDOLIN *et al.*, 1997; MAAROUFI *et al.*, 2007), mas esta região está presente somente em espécies capsuladas. Outro gene utilizado na detecção de *H. influenzae* é o gene *hel* que codifica uma proteína de membrana externa P4 (OMP4) (YADAV *et al.*, 2003). Este gene também é encontrado tanto em cepas capsuladas como não capsuladas. A princípio, *hel* foi selecionado para a padronização da MULTIPLEX-PCR proposta. Contudo, os iniciadores empregados, já existentes na literatura (YADAV *et al.*, 2003) ou desenhados para o presente estudo, apresentaram uma temperatura de hibridação baixa, o que impossibilitou o seu emprego na MULTIPLEX-PCR. Uma vez que vários iniciadores coexistem nesta reação, suas características precisariam ser semelhantes. Outro problema encontrado na utilização de diferentes iniciadores para a detecção do gene *hel* na reação de MULTIPLEX-PCR foi a presença de diversas reações inespecíficas com os outros

microorganismos alvo deste ensaio. O iniciador desenhado para a detecção de *p6* não apresentou reações cruzadas com *N. meningitidis*, *S. agalactiae* e *S. pneumoniae*, bem como com outros possíveis agentes etiológicos da meningite bacteriana, apresentando 100% de especificidade com os antígenos bacterianos testados.

O gene *crtA*, que codifica uma proteína responsável pelo transporte da cápsula, foi selecionado para identificação de *N. meningitidis*. As seqüências dos iniciadores para este gene foram propostos por Corless e colaboradores (2001). Estes autores desenvolveram um método de MULTIPLEX TaqMan PCR (PCR em tempo real) para o diagnóstico de meningites e septicemias, onde foi possível a amplificação do gene *crtA* nos sorogrupos A, B, C, X, Y, Z, 29H, W135 e nas espécies não soro-agrupadas. Na literatura existem vários trabalhos que utilizaram este gene, bem como genes necessários para biossíntese da cápsula (espécie-específicos) para identificação e tipagem de *N. meningitidis* (BORROW *et al.*, 1998; BORROW *et al.*, 1997; CORLESS *et al.*, 2001; GUIVER *et al.*, 2000; LEWIS & CLARKE, 2003; PROBERT *et al.*, 2002; TABA, M.K., 2000; MOTHERSHED *et al.*, 2003). Richardson e colaboradores (2003) compararam a utilização dos genes *crtA*, *siaD* (codifica uma sialiltransferase), *IS 1106* (seqüência de inserção específica de meningococo) e *16S rDNA* no diagnóstico de meningite meningocócica. Os genes *crtA* e *siaD* demonstraram maior especificidade e menor sensibilidade que *IS 1106*, sendo o gene *crtA* mais sensível que *siaD* na detecção de *N. meningitidis*. A menor especificidade para a utilização do gene *IS 1106* foi devido a suas características de mobilidade, podendo ser transferido entre gêneros e espécies bacterianas, comprometendo sua utilização no diagnóstico. Outros genes que poderiam ser utilizados para a detecção de *N. meningitidis* são os que codificam as proteínas Opa, pili tipo IV, LOS, proteína de superfície A de *Neisseria* (FILIPPIS *et al.*, 2005) mas estes genes apresentam a desvantagem de serem expressos por *N. gonorrhoeae*, gerando uma menor especificidade ao MULTIPLEX-PCR (BRANDLEY *et al.*, 2005).

No presente trabalho, os iniciadores desenhados para a detecção de *crtA* não apresentaram reações cruzadas com *H. influenzae*, *S. agalactiae* e *S. pneumoniae*, bem como com outros possíveis agentes etiológicos da meningite bacteriana, apresentando 100% de especificidade com os antígenos bacterianos testados.

Na literatura há vários trabalhos que relatam a detecção molecular de *S. agalactiae* em amostras retais e/ ou vaginais de gestantes, onde os principais genes utilizados são *scpB* (DMITRIEV *et al.*, 2003), *sip* (BERGH *et al.*, 2004; BERGSENG *et al.*, 2007) ou *cfb* (ATKINS *et al.*, 2006). A desvantagem do uso destes genes é sua presença em outras espécies de *Streptococcus* sp. O gene *scpB* está presente em cepas de *S. pyogenes* e *Streptococcus* sp Grupo G e C (FRANKEN *et al.*, 2001), o gene *sip* em cepas de *S. pyogenes* e *S. pneumoniae* (LINDAHL *et al.*, 2005) e o gene *cfb* foi encontrado em *S. pyogenes* e outras espécies de *Streptococcus* sp (GLASER *et al.*, 2002). Outros genes que poderiam ser utilizados para a detecção molecular de *S. agalactiae* são os que codificam as proteínas de superfície, mas são encontrados somente em alguns sorotipos. A proteína β está presente somente nos sorotipos Ia, IIb e V, e a proteína Spb1 está presente apenas no clone ET-1/III. As proteínas da família Alp (α , Alp2, Rib e R28) estão presentes somente em alguns sorotipos, a proteína α foi encontrada nos sorotipos Ia, Ib, II e raramente V, a proteína Alp2 pode ser encontrada em Ia, III e V, a proteína Rib identificada no sorotipo III, e R 28 somente isolada em V, VIII e *S. pyogenes* (LINDAHL *et al.*, 2005). O gene *lmb* codifica uma proteína que se liga a laminina (Lmb), este gene é encontrado em todas as espécies de *S. agalactiae* e também em espécies de *S. pyogenes* com 98% de homologia na sequência de nucleotídeos (TENENBAUN *et al.*, 2007). Inicialmente, o gene *scpB*, que codifica a C5a peptidase, foi selecionado para a padronização da MULTIPLEX-PCR. Contudo, os iniciadores empregados promoveram a amplificação de produtos de PCR à partir do DNA de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*, o que demonstrou sua menor especificidade, impossibilitando o seu emprego na MULTIPLEX-PCR. Assim, o gene selecionado para identificação de *S. agalactiae* foi *fbsA*, que codifica uma proteína que se liga ao fibrinogênio, presente em 90% das cepas (LINDAHL *et al.*, 2005). Os iniciadores para *fbsA* empregados na reação não apresentam reações cruzadas com o DNA de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*, permitindo a correta diferenciação das duas espécies de estreptococos presentes na reação. O iniciador desenhado para a detecção de *fbsA* não apresentou reações cruzadas com *H. influenzae*, *N. meningitidis* e *S. pneumoniae*, bem como com outros possíveis agentes etiológicos da meningite bacteriana, apresentando 100% de especificidade com os antígenos bacterianos testados.

Na literatura, os genes mais utilizados para pesquisa de *S. pneumoniae* são *ply*, que codifica uma pneumolisina (DAGAN *et al.*, 1998; LORETTE *et al.*, 2000; HERNANDEZ *et al.*, 2004; FALGUERA *et al.*, 2002; VAN HAEFTEN *et al.*, 2003; KAIJAKAINEN *et al.*, 2002), *lytA*, que codifica uma autolisina (CHERIAN *et al.*, 1998; MESSMER *et al.*, 1997), PBP2B, que codifica uma proteína que se liga a penicilina (ISAACMAM *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1995), *psa A* que codifica uma proteína de superfície de Adesão (MESSMER *et al.*, 2004) e a sequência de inserção *IS1106* (TZANAKAKI *et al.*, 2003).

O gene *lytA* foi selecionado para identificação de *S. pneumoniae* devido a sua maior sensibilidade e especificidade, por ser conservado entre as cepas de *S. pneumoniae* e apresentar limitada variação genética (0,11 a 0,32%) (WHATMORE & DOWSON, 1999). Messmer e colaboradores (1997) desenvolveram um ensaio molecular usando o gene *lytA* para a identificação de *S. pneumoniae* em amostras de sangue e tecidos parafinados. O ensaio apresentou alta sensibilidade e especificidade. Messmer e colaboradores (2004) compararam a especificidade de quatro ensaios de PCR, com iniciadores para os genes *lytA*, *psaA*, *plyI* e *plyII*. A especificidade dos genes *lytA* e *psaA* foram de 100 e 99%, respectivamente, detectando as cepas de pneumococos capsulados e não capsulados, permitindo diferenciar pneumococos não capsulados de estreptococos atípicos. Não foram encontradas reações cruzadas com *Streptococcus* sp do Grupo Viridans. O gene *ply* demonstrou baixa especificidade, pois foi detectado em microorganismos sem características bioquímicas compatíveis com pneumococos, em cepas resistentes a optoquina e com ausência de cápsula (KAIJALAINEN *et al.*, 2002).

Devido às características do gene *lytA* e sua alta especificidade para *S. pneumoniae*, este gene foi escolhido para inclusão no ensaio molecular aqui proposto. O par de iniciadores desenhado para a detecção de *lytA* não apresentou reações cruzadas com os DNAs de *H. influenzae*, *N. meningitidis* e *S. agalactiae*, bem como com outros possíveis agentes etiológicos da meningite bacteriana, apresentando 100% de especificidade.

Dentre as áreas conservadas no DNA bacteriano estão aquelas que codificam o 5S *rDNA*, 16S *rDNA* (designado como pequena subunidade), 23S *rDNA* e os espaçadores entre estes genes (CLARRIDGE III *et al.*, 2004). Para a MULTIPLEX-PCR do presente trabalho, foi selecionada a região mais utilizada como fonte taxonômica e filogenia para bactérias, codificada pelo gene 16S *rDNA*

(RODICIO *et al.*, 2004). Tais características tornam esse gene um excelente candidato para detecção de qualquer agente etiológico bacteriano em amostras clínicas (CLARRIDGE III *et al.*, 2004), podendo funcionar como um controle interno da reação. Desta forma, o gene *16S rDNA* foi selecionado para a detecção de agentes etiológicos bacterianos e os iniciadores empregados foram desenhados a partir da sequência de DNA obtida no GeneBank.

Após a seleção de todos os genes para compor a reação de MULTIPLEX-PCR, realizou-se um teste a fim de se verificar possíveis reações cruzadas com outros microorganismos, que não bactérias. Os iniciadores selecionados para a detecção dos genes *p6*, *crtA*, *fbsA*, *lytA* e *16S rDNA* não apresentaram reações inespecíficas após testes realizados com amostras clínicas sabidamente positivas para *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, demonstrando 100% de especificidade. Esses resultados aumentaram a confiabilidade do emprego da reação proposta em análises de LCR sugestivos de meningite bacteriana.

Uma vez testada a especificidade da reação, a MULTIPLEX-PCR foi avaliada quanto a sua sensibilidade. Após extração de DNA das amostras clínicas por kits comerciais, foi observada uma sensibilidade de 1pg/μL de DNA bacteriano para os quatros agentes etiológicos, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae* e *S. pneumoniae*. A sensibilidade do método também foi avaliada na ausência do par de iniciadores para o gene *16S rDNA* a fim de se verificar um possível aumento na eficiência da reação. Os resultados obtidos foram os mesmos, não ocorrendo variação na sensibilidade de detecção dos agentes bacterianos. Essa observação foi muito significativa, pois a presença de um par de iniciadores para a detecção do gene *16S rDNA* não só diferencia o ensaio proposto de outros existentes na literatura, mas também aumenta a probabilidade de detecção de outros agentes etiológicos presentes no LCR, que não *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae* e *S. pneumoniae*. Neste trabalho a presença dos iniciadores para o gene *16S rDNA* possibilitou um aumento na detecção em torno de 50% nas amostras com cultura negativa.

Em relação ao lisado bacteriano, a sensibilidade foi avaliada em função do número de UFC presentes na amostra. O número de unidades formadoras de colônias necessárias para a detecção de *S. agalactiae* e *S. pneumoniae* foi maior em relação a *H. influenzae* e a *N. meningitidis*, conforme **Tabela 4**. Esta diferença pode ser explicada pela constituição da parede celular destes microorganismos,

predominantemente constituída por peptidoglicano. Para as cepas Gram-positivas, com o objetivo de melhorar esta sensibilidade, foi adicionada à amostra lisozima ou lisostafina. A lisostafina inibiu a reação molecular, pois não foi observada nenhuma amplificação. Em relação à lisozima, foi observado um precipitado no tubo de reação e não houve amplificação de nenhum produto de PCR. A amplificação possivelmente foi inibida pela presença da enzima na reação de MULTIPLEX-PCR, uma vez que a amostra tratada foi utilizada diretamente no ensaio molecular. Contudo, o ensaio conseguiu detectar todas as amostras que eram positivas para *S. pneumoniae* e suspeita clínica de *S. agalactiae*. Segundo Backman e colaboradores (1999), a concentração de *S. agalactiae* em LCR é alta ($\geq 10^5$ UFC/mL), o que aumenta a probabilidade da detecção deste microorganismo pela MULTIPLEX-PCR proposta. O MULTIPLEX-PCR demonstrou alta sensibilidade, pois conseguiu identificar uma amostra positiva para *S. agalactiae* com resultado de cultura negativa e com suspeita clínica de sepse por *S. agalactiae*. Este resultado demonstra que a MULTIPLEX-PCR permitiu a detecção do agente etiológico mesmo em baixas concentrações ou sem viabilidade, sendo mais sensível que a cultura bacteriológica.

A MULTIPLEX-PCR padronizada no presente trabalho foi aplicada em 447 amostras de LCR, onde 27 amostras eram positivas para cultura. As amostras foram divididas de acordo com os resultados de análise dos LCRs, em Grupo I, II e III, sendo Grupo I amostras positivas para cultura, Grupo II as amostras que apresentaram alguma alteração bioquímica, hematológica, imunológica e/ou microbiológica (bacterioscopia) e Grupo III amostras consideradas negativas, sem alterações do LCR.

As amostras positivas para MULTIPLEX-PCR se enquadraram nos Grupos I e II. A MULTIPLEX-PCR detectou todas as amostras positivas do Grupo I e 13 amostras pertencentes ao Grupo II. Todas as amostras do Grupo III foram negativas para o ensaio de MULTIPLEX-PCR (**Tabela 4**). Assim, todas as amostras de LCR positivas para cultura e bacterioscopia, também foram positivas para a MULTIPLEX-PCR, sendo um ensaio com 100% de sensibilidade, não deixando de identificar nenhuma cultura positiva.

As 13 amostras de LCR, cultura negativa e MULTIPLEX-PCR positiva, apresentaram alterações citológicas, bioquímicas, imunológicas e microbiológicas (bacterioscópico) sugestivas de meningite. Estes dados laboratoriais auxiliaram na confirmação dos resultados obtidos na MULTIPLEX-PCR, como a presença de

amostras com bacterioscopia, hemocultura ou aglutinação em látex positiva para o agente etiológico identificado no ensaio molecular; pacientes sob antibioticoterapia durante a punção lombar e com o diagnóstico prévio de meningite bacteriana, nestas amostras foi identificado no ensaio molecular o mesmo agente etiológico isolado na cultura; paciente sob o uso de antibióticos e com os dados laboratórios sugestivos de meningite bacteriana; criança em contato com o padrasto com meningite meningocócica, na sua amostra de LCR foi identificado meningococo e amostras com a presença de algum tipo de alteração bioquímica ou hematológica que puderam confirmar o resultado molecular. Assim, podemos sinalizar que o ensaio molecular proposto apresenta maior sensibilidade e especificidade em relação aos métodos convencionais no diagnóstico, confirmando a suspeita clínica evidenciada pelos métodos em questão.

A avaliação das amostras com cultura negativa nos mostrou que, o ensaio molecular proporcionou um aumento em torno de 50% na detecção de agentes etiológicos das meningites bacterianas. Esses dados mais uma vez salientam a grande importância deste método diagnóstico, uma vez que o grau de comprometido do paciente com meningite é elevado caso a doença não seja tratada corretamente.

O ensaio de PCR em um único tubo é um método simples, rápido, confiável, permite a análise de um grande número de amostra e facilmente implementável para a confirmação de meningite bacteriana. Mais ainda, pode auxiliar no diagnóstico de meningite com cultura de LCR negativa, particularmente para pacientes que previamente iniciaram antibioticoterapia, seja pela suspeita de meningite ou alguma outra patologia. E auxiliar no diagnóstico diferencial entre meningite viral e bacteriana, onde os resultados dos métodos convencionais são inclusivos. Sugerimos que a MULTIPLEX-PCR seja uma importante etapa para um controle e reconhecimento mais preciso das meningites bacterianas e que seja implementado na rotina laboratorial dos hospitais.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados pode-se concluir:

- Este ensaio molecular possui sensibilidade e especificidade superior a análise quimiocitológica, imunológica e microbiológica do LCR na detecção da etiologia das meningites bacterianas.
- É um ensaio rápido, de fácil execução e que pode auxiliar na difícil decisão médica no diagnóstico diferencial de meningite bacteriana e viral, para que o paciente inicie o tratamento adequado evitando o aparecimento de seqüelas.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDERSON, E.E.; TAKAHASHI S, WANG Y, ARMSTRONG, J.; MILLER, D.V.; BOHNSACK ,JF. Subtractive hybridization identifies a novel predicted protein mediating epithelial cell invasion by virulent serotype III group B Streptococcus agalactiae. *Infect Immun.* v.71, p.6857-6863, 2003.

AIMONI, C.; PELUCCHI, S.; GRASSO, D.; LIBANORE, M.; MARTINI, A. Bacterial meningitis complicating suppurative otitis media and sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* v.132, p.965-976, 2005.

ATKINS, K. L.; ATKINSON, R.M.; SHANKS, A.; PARVIN, C.A.; DUNNE, W.M.; GROSS, G. Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Group B Streptococcus Detection Using an Improved Culture Method. *Obstetrics & Gynecology.*v.108, p. 488-491, 2006.

BÄCKMAN, A.; LANTZ, P.; RÅDSTRÖM, P.; OLCÉN, P. Evaluation of an extended diagnostic PCR assay for detection and verification of the common causes of bacterial meningitis in CSF and other biological samples. *Mol Cell Probes.*v.13, p.49-60, 1999

BAINES, P.B.; HART, C.A. Severe meningococcal disease in childhood. *British Journal of Anaesthesia.*v.90, p. 72-83, 2003.

BALACHANDRAN, P.; HOLLINGSHEAD, S.K.; PATON, J.C.; BRILES, D.E. The autolytic enzyme LytA of Streptococcus pneumoniae is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bacteriol.* v.183,p.3108-3116, 2001

BASHIR. H.E.; LAUNDY, M.; BOOY, R. Diagnosis and treatment of bacterial meningitis. Arch. Dis. Child.v.88, p.615-629, 2003.

BECKMANN, C.; WAGGONER, J.D.; HARRIS, T.O.; TAMURA, G.S.; RUBENS, C.E. Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. Infect Immun. v.70, p.2869-76, 2002.

BERGH, K. ; STOELHAUG, A.; LOESETH, K.; BEVANGER, L. Detection of group B streptococci (GBS) in vaginal swabs using real-time PCR with TaqMan probe hybridization. Indian J. Med Res. v. 119, p. 221-223, 2004.

BERGSENG, H.; BEVANGER, L.; RYGG, M.; BERGH, K. Real-time PCR targeting the sip gene for detection of group B Streptococcus colonization in pregnant women at delivery. J Med Microbiol, v.56, p.223-228,2007

BERRINGTON, A.W.; TAN, Y.C.; SRIKHANTA, Y.; KUIPERS, B.; VAN DER LEY, P.; PEAK, I.R.; JENNINGS, M.P. Phase variation in meningococcal lipooligosaccharide biosynthesis genes. FEMS Immunol Med Microbiol. v.34, p.267-275, 2002.

BILLAL, D.S.; HOTOMI, M.; SUZUMOTO, M.; YAMAUCHI, K.; KOBAYASHI, I.; FUJIHARA, K.; YAMANAKA, N. Rapid identification of nontypeable and serotype b *Haemophilus influenzae* from nasopharyngeal secretions by the multiplex PCR. International J. Pediatric Otorhinolaryngology. v.71, p.269-274, 2007.

Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA 5) - Situação Epidemiológica das Meningites Bacterianas no Estado de São Paulo, ano 1, número 5, 2004.

Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA 11) - Campanha de Vacinação Contra Doença Meningocócica do Sorogrupo C - DIR XXIII Sorocaba - Município de Itapeva/SP, ano 1, número 11, 2004.

Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA 17) – CARVALHANAS, T.R.M.P. BRANDILEONE, M.C.C.; ZANELLA,R.C. Meningites bacterianas. ano 2, volume 17. 2005.

Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA 37) – FERNANDES, F.C.; CARVALHANAS, T.R.M.P.; BARBOSA, H.A.; SATO, H.K.; REINA, M.C.F.P.; FERREIRA, E.R., MORO, E.C.R.; NETO, J.M.P.; CORTEZ, M.G.; Cruz, S.R.A. Surto de Doença Meningocócica no Município de Estrela D'Oeste, SP, Setembro de 2006: da investigação ao controle. v.4, número 37, 2007.

Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA 44) - FERNANDES, R.M.B.P.; DORO, C.M.; REIS, R.; ABEL PEREIRA DE MENEZES DA SILVA, A.P.M.; SOUZA, D.F.; BARBOSA, H.A.; FUKASAWA, L.O.; GONÇALVES, M.G. Doença meningocócica: investigação de surto comunitário no Distrito Administrativo do Ipiranga, município de São Paulo, v.4, número 44, 2007.

Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA 47) KEMP, B., FERREIRA, M.C.; ROSSI, C.G.; YANAGIZAWA, N.; SILVEIRA, J. Investigação e controle de surto comunitário de doença meningocócica no Município de Campinas (SP). v.4, número 47, 2007. Clin Biochem. v.28, p.567-572. 1995

BORROW, R.; GUIVER, M.; SADLER, F.; KACZMARSKI, E.B.; FOX, A.J. False positive diagnosis of meningococcal infection by the IS1106 PCR ELISA. FEMS Microbiol Lett. v.162, p.215-218, 1998.

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

BRADLEY, C.J.; GRIFFITHS, N.J.; ROWE, H.A.; HEYDERMAN, R.S.; VIRJI, M. Critical determinants of the interactions of capsule-expressing *Neisseria meningitidis* with host cells: the role of receptor density in increased cellular targeting via the outer membrane Opa proteins. *Cell Microbiol.* v.7, p.1490-1503, 2005.

CHERIAN, T.; LALITHA, M.K.; MANOHARAN, A.; THOMAS, K.; YOLKEN, R.H.; STEINHOFF, M.C. PCR- Enzyme Immunoassay for Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in Cerebrospinal Fluid Samples from Patients With Culture –Negative Meningitis. *J. Clin.Microbiol.* v. 36, p.3605-3608, 1998.

CLARRIDGE III, J.E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews.* v.17, p.840-862, 2004.

CORLESS, C.E.; GUIVER, M.; BORROW,R.; EDWARDS-JONES, V.; FOX, A.J.; KACZMARSKI, E.B. Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* in Suspected Cases of Meningitidis and Septicemia using Real Time PCR. *J. Clin.Microbiol.* v.39, p. 1553-1558, 2001.

DAGAN, R.; LEIBOVITZ, E.; GREENBERG, D.; YAGUPSKY, P.; FLISS, D.M.; LEIBERMAN, A. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal colonization during the first days of antibiotic treatment in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis* v.17, p.880-855.1998.

DAVIDSEN, T.; TONJUM, T. Meningococcal genome dynamics. *Nature Reviews.* v.4, p11-22, 2006.

DEGHMANE, A.E.; PETIT, S.; TOPILKO, A.; PEREIRA, Y.; GIORGINI, D. LARRIBE M, TAHA MK. Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. *EMBO J.* v.19, p.1068-1078, 2000

DMITRIEV, A.; SUVOROV, A.; SHEN, A.D.; YANG, Y.H. Clinical diagnosis of group B streptococci by scpB gene based PCR. Indian J Med Res. V.119, p.233-6, 2004

ECEVIT, I.Z.; MCCREA, K.W.; PETTIGREW, M.M.; SEN, A.; MARRS, C.F.; GILSDORF, J.R. Prevalence of the hifBC, hmw1A, hmw2A, hmwC, and hia Genes in Haemophilus influenzae Isolates. J Clin Microbiol. v.42, p.3065-3072, 2004.

EDWARDS, M.S.; BAKER, J.C.; Group B streptococcal infections, p.1091-1156. In J.S. Remington and J.O. Klein (ed.), Infectious diseases of the fetus and the newborn infant. The W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.2001

FAILACE, L.; WAGNER, M.; CHESKY, M.; SCALCO, R.; JOBIM, L.F. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction for the diagnosis of bacterial meningitis. Arq Neuropsiquiatr. v.63, p.920-924, 2005.

FALGUERA, M.; LOPEZ, A.; NOGUES, A.; PORCEL, J. M.; RUBIO-CABALLERO, M. Evaluation of the polymerase chain reaction method for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in pleural fluid samples. Chest. v.122, p.2212-2216, 2002.

FARIA S.M. Dosagens de citocinas (Fator de necrose tumoral alfa e interleucina –1 beta) no liquido cefalorraquidiano em crianças com meningite. São Paulo. Universidade Federal de São Paulo, 1996.

FEIGIN, R.D.; PEARLMAN, E. Bacterial meningitis beyond the neonatal period. In: Feigin RD, Cherry JD, editors. Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 4º ed. Philadelphia: WB Saunders, p.400-29, 1998.

FILIPPIS, I.; NASCIMENTO, C.R.; CLEMENTINO, M.B.; SERENO, A.B.; SOUZA, N.N.; RILEY, L.W. Rapid detection of *Neisseria meningitidis* in

cerebrospinal fluid by one-step polymerase chain reaction of the *nspA* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. V, 51, p. 85-90, 2005.

FRANKEN, C.; HAASE, G.; BRANDT, C.; WEBER-HEYNE-MANN, J.; MARTIN, S.; LAMMLER, C.; PODBIELSKI, A.; LUTTICKEN, R.; SPELLERBERG, B. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *Imb*. *Molecular Microbiology*, v.41, p.925-935, 2001.

GILSDORF, J.R.; McCREA, K.W.; MARRS, C.F. Role of Pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization. *Review. Infec and Immunv*.65, p.2997-3002, 1997.

GLASER, P.; RUSNIOK, C.; BUCHRIESER, C.; CHEVALIER, F.; FRANGEUL, L.; MSADEK, T.; ZOUINE, M.; COUVÉ, E.; LALIOUI, L.; POYART, C.; TRIEU-CUOT, P. KUNST, F. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol*. v.45, p.1499-1513, 2002.

GRAY, F.; NORDMANN, P. Bacterial infections. In *Greenfields Neuropathology: Infections*. Graham, D.I., and Lantos, P.L. (eds). London: Arnold, p.113-156, 1997.

GREENWOOD, B. The epidemiology of acute bacterial meningitis in tropical Africa. London: Academic Press. p.61-91, 1987.

GUIVER, M.; BORROW, R.; MARSH, J.; GRAY, S.J.; KACZMARSKI, E.B.; HOWELLS, D.; BOSELEY, P.; FOX, A.J. Evaluation of the Applied Biosystems automated Taqman polymerase chain reaction system for the detection of meningococcal DNA. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v.28, p.173-179. 2000.

GUTEKUNST, H.; EIKMANN, B.J.; REINSCHIED, D.J. The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. *Infect Immun.* v.72, p.3495-34504, 2004.

HAMMERSCHMIDT, S.; BETHE, G.; REMANE, P.H.; CHHATWAL, G. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*, v.67, p.1683-1687, 1999.

HARRISON, L.H. Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. *Clin Microbiol Rev. Review*, v.19, p.142-164, 2006.

HARVEY, D.; HOLT D.E.; BELDFORD, H. Bacterial meningitis in the newborn: a prospective study of mortality and morbidity. *Semin Perinatol. Review*, v.23, p.218-225, 1999.

HASSAN KING, M.; ADEGBOLA, R.; BALDEH, I.; MULHOLAND, K.; OMOSIGHO, C.; OPARAUGO, A.; USEN, S.; PALMER, A.; SCHNEIDER, G.; SECKA, O.; WEBER, M. AND GREENWOOD, B. A polymerase chain reaction for the diagnosis of *Haemophilus influenzae* type b disease in children and its evaluation during a vaccine trial. *Pediatric Infectious Disease Journal.* v. 17, p.309-312, 1998.

HENDOLIN, P.H.; MARAKKANEN, A.; YLIKOSKI, J. AND WAHLFERS, J. Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions. *Journal of Clinical Microbiology.* v, 35, p.2854-2858, 1997.

HERNÁNDEZ, C.; DURÁN, C.; ULLOA, M.T.; PRADO, V. Assessment of two DNA extraction methods to amplify the pneumolysin gene (PLY) from blood culture samples of *Streptococcus pneumoniae* *Rev Med Chil*, v.132, p.533-538. 2004.

HOSKINS, J.; ALBORN, W.E. JR; ARNOLD, J.; BLASZCZAK, L.C.; BURGETT, S.; DEHOFF, B.S.; ESTREM, S.T.; FRITZ, L.; FU, D.J.; FULLER, W.; GERINGER, C.; GILMOUR, R.; GLASS, J.S.; KHOJA, H.; KRAFT, A.R.; LAGACE, R.E.; LEBLANC, D.J.; LEE, L.N.; LEFKOWITZ, E.J.; LU, J.; MATSUSHIMA, P.; MCAHREN, S.M., MCHENNEY, M., MCLEASTER, K.; MUNDY, C.W.; NICAS, T.I.; NORRIS, F.H.; O'GARA, M.; PEERY, R.B.; ROBERTSON, G.T.; ROCKEY, P.; SUN, P.M.; WINKLER, M.E.; YANG, Y.; YOUNG-BELLIDO, M.; ZHAO, G.; ZOOK, C.A.; BALTZ R.H.; JASKUNAS, S.R.; ROSTECK, P.R. JR; SKATRUD, P.L.; GLASS, J.I. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. J Bacteriol. v.183, p. 5709-5717, 2001.

HOTOMI, M.; TABATA, T.; KALINCHI, H.; KUNIMOTO, M. Detection of *H. influenzae* in middle ear of otitis media with effusion by polymerase chain reaction. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. v. 27, p.119-126, 1993.

ISAACMAN, D.J.; ZHANG, Y.; RYDQUIST-WHITE, J.; et al. Identification of patient with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia and meningitis by polymerase chain reaction (PCR). Mol. Cell. Prob. v.9, p.157-160, 1995.

ISHIWADA, N.; CAO, L.D.; KOHNO, Y. PCR-based capsular serotype determination of *Haemophilus influenzae* strains recovered from Japanese paediatric patients with invasive infection. Clin Microbiol Infect. v.10, p.895-8, 2004.

JEDRZEJAS, M.J. Pneumococcal virulence factors: structure and function. Microbiol. Mol. Biol. Rev. v.65, p.187-207, 2001.

KAIJALAINEN, T.; RINTAMÄKI, S., HERVA, E.; LEINONEN, M. Evaluation of gene-technological and conventional methods in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Microbiological Methods. V.51, p.111-118, 2002.

KAPLAN, S.L.1992. Rapid diagnostic techniques. p 2384-2395. In. R.D. Feigin and J.D. Cherry (ed.). Textbook of pediatric infectious diseases. 3 rd ed. The W.B. Saunders Co.,Philadelphia.Pa.

KAUR, R.; SHARMA, A.; MAJUMDAR, S.; GANGULY, N.K.; CHAKRABORTI, A. Outer-membrane-protein subtypes of *Haemophilus influenzae* isolates from North India.J Med Microbiol. v.52, p.693-696, 2003

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

LAW, M.R.; PALOMAKI, G.; ALFIREVIC, Z.; GILBERT, R.; HEATH,P.; MCCARTNEY, C.; REID, T.; SCHARG,S. The prevention of neonatal group B streptococcal disease: a report by a working group of the Medical Screening Society. v.12, p.60-68, 2005.

LEIMKUGEL, J.; FORGOR, A.A.; GAGNEUX, S.; PFLÜGER, V.; FLIERL, C.; AWINE, E.; NAEGELI, M.; DANGY, J.; SMITH, T.; HODGSON, A.; PLUSCHKE, G. An outbreak of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* meningitis in northern Ghana with features that are characteristic of *Neisseria meningitidis* meningitis epidemics. v.15; p.192- 199. 2005

LEWIS, C.; CLARKE, S.C. Identification of *Neisseria meningitidis* serogroups Y and W135 by *siaD* nucleotide sequence analysis. J. Clin. Microbiol. v.41,p.2697-2699, 2003.

LIN, H.W.; YIN, J.H.; LO, J.P.; WANG, Y.H.; LEE, S.Y.; LU, J.J. Use of universal polymerase chain reaction assay and endonuclease digestion for rapid detection of *Neisseria meningitidis*. J. Microbiol. Immunol Infect. v. 37, p. 371-374, 2004.

LINDAHL, G.; STÅLHAMMAR-CARLEMALM, M.; ARESCHOUG, T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clin Microbiol Rev. Review.v.18, 102-127, 2005

LOPES, M.; SANTOS, S.I.S. Contribuição de amostras de sangue no diagnóstico laboratorial da doença meningocócica. Rev. Inst. Adolfo Lutz.v.61, p.45-49, 2002.

LORENTE, M.L.; FALGUERA, M.; NOGUES, A.; GONZALEZ, A.R.; MERINO, M.T.; CABALLERO, M.R. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by polymerase chain reaction (PCR) in whole blood: A prospective clinical study. Thorax. v.55, p.133-137, 2000.

LOEB MR, SMITH DH Outer membrane protein composition in disease isolates of *Haemophilus influenzae*: pathogenic and epidemiological implications 1980 Infect Immun.v.30, p.709-717, 1980

MAAROUFI, Y.; DE BRUYNE, J.M.; HEYMANS, C.; CROKAERT, F. Real-time PCR for determining capsular serotypes of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol.v.45, p.2305-2308, 2007

MESSMER, T.O.; BLACK, C.M.; FACKLAM, R.R. Discrimination of *Streptococcus pneumoniae* from other upper respiratory tract streptococci by arbitrarily primed PCR. v.28, p.567-72, 1995.

MESSMER, T.O; WHITNEY, C.G.; FIELDS, B.S. Use of polymerase chain reaction to identify pneumococcal infection associated with hemorrhage and shock in two previously healthy young children. Clinical Chemistry. v.43, p.930-935, 1997

MESSMER, T.O; SAMPSON, J.S.; STINSON, A.; WONG, B.; CARLONE, G.M.; FACKLAM, R.R. Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. v.49, p.249-254, 2004.

MOTHERSHED, E.A.; SACCHI, C.T.; WHITNEY, A.M.; BARNETT, G.A.; AJELLO, G.W.; SCHIMINK, S.; MAYER, L.W.; PHELAN, M.; TAYLOR, T.H.;

BERNHARDT, S.A.; ROSENSTEIN, N.E.; POPOVIC, T. Use of Real-Time PCR to Resolve Slide Agglutination Discrepancies in Serogroup Identification of *Neisseria meningitides*. J. Clinic Microbiology. v.42, p.320-328, 2003.

NEGRINI, B.; KELLEHER, K.J.; WALD, E.R. Cerebrospiral Fluid Findings in Aseptic Versus Bacterial Meningitis. Pediatrics. v. 105, p.316-319, 2000.

NELSON, M.D.; MUNSON, R.S.Jr.; APICELLA, M.A.; SIKKEMA, D.J. ; MOLLESTON, J.P.; MURPHY, T.F. Molecular Conservation of the P6 Outer Membrane Protein among Strains of *Haemophilus influenzae*: Analysis of Antigenic Determinants, Gene Sequences, and Restriction Fragment Length Polymorphisms. Infection and Immunity, v. 59, p. 2658-2663, 1991.

NIZET, V.; RUBENS, C. Factores de virulencia of Streptococcus Grupo B com importância em las infecciones neonatales. Asociasn Argentina de Microbiologia. Boletin nº 146. Enero. 2001.

OGUNNIYI, A.D.; GIAMMARINARO, P.; PATON, J.C. The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed *in vivo* v. 148, p.2045-2053, 2002.

OSELKA, G. Prevention of pneumococcal disease in Brazil. J.Pediatr (Rio J.) v.79, p.195-196, 2003

PERKINS, B.A.; PINNER R.W.; STEPHENS, D.S. Medicine for practicing physician, In: Hurst J.W. (Ed). Appleton and Lange, Norwalk, CT, p. 412-413, 1996.

PIETROCOLA, G; SCHUBERT, A.; VISAI, L.; TORTI, M., FITZGERALD, JR.; FOSTER, T.J.; REINSCHIED, D.J.; SPEZIALE, P. FbsA, a fibrinogen-binding protein from *Streptococcus agalactiae*, mediates platelet aggregation. Blood. 2005 Feb v.105, p.1052-1059, 2004.

PROBERT, W.S.; BYSTROM, S.L.; KHASHE, S.; SCHRADER, K.N.; WONG, J.D. 5' exonuclease assay for detection of serogroup Y *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol, v.40, p.4325-4328, 2002

PUJOL, C.; EUGÈNE, E.; MARCEAU, M.; NASSIF, X. The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. : Proc Natl Acad Sci U S A. V.96, p.4017-22, 1999.

RAO, V. K.; KRASAN, G. P.; HENDRIXSON, D. R.; DAWID, S.; ST. GEME III, J. W. Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to nontypeable *Haemophilus influenzae*. FEMS Microbiol.v. 23:p.99-129,1999.

RAY, C.G.; SMITH, J.A.; WASILAUSKAS, B.L.; ZABRANSKY, R. CUMITECH, 14A - Laboratory Diagnosis of Central Nervous System Infections. Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology. Coordinating ed., John A. Smith. American Society for Microbiology, Washington, 1993.

RAY, P.; BADAROU-ACOSSO, G.; VIALLO, A.; BOUTOILLE, D.; ARTHAUD, M.; TRYSTRAM, D.; RIOU, B. Accuracy of the cerebrospinal fluid results to differentiate bacterial from non bacterial meningitis in case of negative gram-stained smear. American Journal of Emergency Medicine, v.25, p.179-184, 2007.

REILLY, T.J.; CHANDE, D.L.; SMITH, A.L. Outer membrane lipoprotein e (P4) of *Haemophilus influenzae* is a novel phosphomonoesterase. J Bacteriol. p.18, p.6797-6805,1999.

RICHARDSON, D.C.; LOUIE, L.; LOUIE, M.; SIMOR, A.E. Evaluation of a Rapid PCR Assay for Diagnosis of Meningococcal Meningitis. Journal Clinical Microbiology. v. 41, p.3851-3853, 2003.

RODICIO, M.R.; MENDOZA, M.C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones em microbiología clínica. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.v.22,p.238-245, 2004.

ROSENOW, C.; RYAN, P.; WEISER, JN.; JOHNSON, S.; FONTAN, P.; ORTQVIST, A.; MASURE, HR. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumonia*. v.25, p.819-829,1997.

SCHELD, W.M.; KOEDEL, U.; NATHAN, B. Pathophysiology of Bacterial Meningitis: Mechanism (s) of Neuronal Injury. v.186, p.225-233, 2002.

SCHUBERT, A.; ZAKIKHANY, K.; SCHREINER, M.; FRANK, R.; SPELLERBERG, B.; EIKMANN, B.J.; REINSCHIED, D.J. A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol Microbiol*. v.46, p.557-69, 2002.

SCHUCHAT, A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev. Review*, v.11,;p.497-513,1998.

SCHUCHAT, A.; ROBINSON, K.; WENGER, J.D.; HARRISON, L.H.; FARLEY, M.; REINGOLD, A.L.; et al. Bacterial meningitidis in the United States in 1995. *N. Engl. J. Med*, v.337, p.970-6, 1997.

SCHUCHAT, A.; ROOME, A.; ZELL, E.R.; LINARDOS, H.; ZYWICKI, S.; O'BRIEN, K.L. Integrated monitoring of a new group B streptococcal disease prevention program and other perinatal infections. *Matern Child Health J*. v.6, p.107-114,2002

SEEHUSEN, D.A.; MARK, M.D.; REEVES, M.D.; FOMIN, D.A. Cerebrospinal Fluid Analysis. *American Family Physician*. v.68, p.1103-1108, 2003.

SIMÕES, L.L.; ANDRADE, A.L.; LAVAL, C.A.; OLIVEIRA, R.M.; SILVA, S.A.; MARTELLI, C.M.; ALVES, S.L.; ALMEIDA, R.M.; ANDRADE, J.G. Impact of *Haemophilus influenzae b* (Hib) vaccination on meningitis in Central Brazil]Rev Saude Pública. V.38, p.664-70, 2004

SINGHI, S.; SINGHI, P.; BARANWAL, A.K. Bacterial meningitis in children: critical care needs. *Indian J Pediatr.* v.68, p.737-747, 2001.

SPELLERBERG, B.; ROZDZINSKI, E.; MARTIN, S.; WEBER-HEYNE-MANN, J.; SCHNITZLER, N.; LÜTTICKEN, R.; PODBIELSKI, A. Lmb, a protein with similarities to the Lral adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect Immun.* v.67, p.871-8, 1999

ST GEME, J.W.; CUTTER, D.; BARENKAMP, S.J. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J. Bacteriol.* v.176, p.6281-6287, 1996.

TABA, M.K. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* v.38, p.855-857, 2000.

TENENBAUM, T.; SPELLERBERG, B.; ADAM, R.; VOGEL, M.; KIM, K.S.; SCHROTEN, H. *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. *Microbes Infect.* v.9, p.714-720, 2007.

TRIJBELS-SMEULDERS, M.A.; KOLLÉE, L.A.; ADRIAANSE, A.H.; KIMPEN, J.L.; GERARDS, L.J. Neonatal group B streptococcal infection: incidence and strategies for prevention in Europe. *Pediatr Infect Dis.* v.23, p.172-3, 2004

TURK, D.C. *Haemophilus influenzae* type b resistant to both chloramphenicol and ampicillin in Britain. *Br Med J (Clin Res Ed).* v.284, p.6329, 1982.

TZANAKAKI, G.; TSOPANOMICHALOU, M.; KESANOPOULOS, K.; MATZOURANI, R.; SIOUMALA, M.; TABAKI, A.; KREMASTINO, J. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect.* v.11, 386-390, 2005.

TZENG, Y.; STEPHENS, D.V. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes and Infection*, v.2, p. 687-700, 2000.

TURTON, J.F.; WOODFORD, N.; GLOVER, J.; YARDE, S.; KAUFMANN, M.E.; PITT, T.L. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the bla_{oxa}-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. *Journal Clinical Microbiology*, v. 44, p. 2974-2976, 2006.

UEYAMA, T.; KURONO, Y.; SHIRABE, K.; TAKESHITA, M.; MOGI, G. High incidence of *Haemophilus influenza* in nasopharyngeal secretions and middle ear effusions as detected by PCR. *Journal Clinical Microbiology*, v. 33, p. 1835-1838, 1995.

UZUKA, R.; KAWASHIMA, H.; HASEGAWA, D.; IOI, H.; AMAHA, M.; KASHIWAGI, Y.; TAKEKUMA, K.; HOSHIKA, A.; CHIBA, K. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by using multiplex-PCR and real time PCR. *Pediatrics International*, v.46,p. 551-554, 2004.

VAN DEUREN, M.V.; BRANDTZAEG, P.; MEER, J.W.M.V. Update on Meningococcal Disease with Emphasis on Pathogenesis and Clinical Management. *Clin. Microbiology Reviews*, v.13, p.144-166, 2000.

VAN GASTEL, E.; BRUYNSEELS, P.; VERSTREPEN, W.; MERTENS, A. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of pneumococcal and meningococcal meningitis in a tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. v.26, p.651-653, 2007

VAN KETEL, R.J. DE WEVER, B.; VAN ALPHEN, L. Detection of *H. influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. *Journal Clinical Microbiology*.v.33, p.271-276, 1990.

VAN HAEFTEN, R.; PALLADINO, S.; KAY, I.; KEIL, T.; HEATH, C.; WATERER, G.W. A quantitative LightCycler PCR to detect *Streptococcus pneumonia* in blood and CSF. *Diagn Microbiol Infect Dis*. v.47, p.407-14, 2003.

WATSON, M.A.; SCOTT, M.G. Clinical Utility of Biochemical Analysis of Cerebrospinal Fluid. Clin. Che. v.41, p.343-360, 1995.

WATANABE M, MIYAKE K, YAMAMOTO S, KATAOKA Y, KOIZUMI S, ENDO T, OZAKI A, IJIMA S. Identification of sialyltransferases of *Streptococcus agalactiae*. J Biosci Bioeng, v93, p.610-613, 2002.

WHATMORE, A.M.; DOWSON, C.G. The autolysin-encoding gene (lytA) of *Streptococcus pneumoniae* displays restricted allelic variation despite localized recombination events with genes of pneumococcal bacteriophage encoding cell wall lytic enzymes. Infect Immun. V.67, p.4551-4556, 1999

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* WHO/CDS/CSR/EDC/99/7/EN1997

YADAV, M.C.; CHAKRABORTI, A.; RAY, P.; SAPRU, S.; MAJUMDARAND, S.; NARAN, A. Rapid detection of *Haemophilus influenzae* by *hel* gene polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol., v.37, p.190-195, 2003.

YADAV, M.C.; CHAKRABORTI, A.; RAY, P.; SAPRU, S.; MAJUMDARAND, S.; NARAN, A. Rapid detection of *Haemophilus influenzae* by *hel* gene polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol., v.37, p.190-195, 2003.

ZHANG, Y.; ISAACMAN, D.J.; WADOWSKY, R.M.; RYDQUIST-WHITE, J.; POST, J.C.; EHRLICH, G.D. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. J Clin Microbiol.v.33, p.596-601,1995.

Anexos

8. ANEXOS

Meios de cultura

Meios Comerciais

Os meios de cultura, obtidos sob a forma desidratada, foram preparados de acordo com as especificações do fabricante, em água destilada e esterilizado por autoclavação. Os meios de cultura utilizados foram: TSB ("Trypticase Soy Broth"), Agar MacConckey, Ágar Sangue e Agar Chocolate. Para os meios de Agar Sangue e Agar Chocolate após a autoclavação foram resfriados a aproximadamente 45°C e acrescidos de 5% de sangue de carneiro. Ao Agar chocolate foi adicionado suplementos V e X, de acordo com as especificações do fabricante.

Soluções

Corante de corrida para eletroforese

Azul de Bromofenol	0,25 %
Xileno cianol	0,25 %
Ficoll tipo 400	25,0 %

O Ficoll foi dissolvido a quente em água bidestilada e, após a dissolução dos corantes e, completado o volume com água bidestilada, a mistura foi mantida à temperatura ambiente.

Solução de Brometo de Etídio

O Brometo de Etídio foi preparado a 5 mg/ml em tampão Tris a 0,05 M pH 8,5 e mantido em frasco escuro à temperatura ambiente.

Solução Tampão (TBE) Tris-Borato-EDTA pH 8,2 (10X)

Trizma base	890 mM
Na ₂ EDTA	25 mM
Ácido Bórico	89 mM

Após a dissolução a quente do Na_2EDTA , foram adicionados o Tris, ácido bórico e água bidestilada para completar o volume sob agitação magnética até completa dissolução. A concentração de uso utilizada foi 0,5X.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADIA DE SERVIÇOS DE SAÚDE
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS
DIVISÃO CIENTÍFICA

PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 38/07

TÍTULO: "DETECÇÃO DE NEISSERIA MENINGITIDIS, STREPTOCOCCUS AGALACTIAE, STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE E HAEMOPHILUS INFLUENZAE POR MULTIPLEX-PCR EM AMOSTRAS DE LÍQUOR"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL NO IIER: ANA LÚCIA INNACO DE CARVALHO

AUTOR PRINCIPAL: RENATA CHAVES ALBUQUERQUEMARUM

ORIENTADORA: MARINA BAQUERIZO MARTINEZ

COMISSÃO CIENTÍFICA

Parecer C.C. nº 119/07

A Comissão Científica, em reunião realizada em 17 de julho de 2007, **APROVOU** o presente protocolo de pesquisa.

São Paulo, 17 de julho de 2007.

Profa. Dra. Luiza Helena F. R. Carvalho.
Presidente da Comissão Científica

São Paulo, 08 de dezembro de 2006.

Il^{mo(a)}. S^{r(a)}.

Dra. Charlotte Marianna Hársi
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: Projeto de Pesquisa “Aplicação de reação em cadeia de Polimerase (PCR) no diagnóstico rápido de vírus neurotrópicos” - Registro CEP: 459/04

Prezado(a) Senhor(a)

Em 8 de dezembro de 2006, durante reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, foi apresentada e aprovada a alteração solicitada por V.Sa., conforme segue:

- 1- incluir o diagnóstico bacteriológico, com técnicas de biologia molecular para identificação de agentes etiológicos;
- 2- troca do nome inicial do projeto para “Aplicação de técnicas de biologia molecular no diagnóstico rápido de infecções do sistema nervoso central”.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa – HU/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Microbiologia

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
CEP 05508-900
Cidade Universitária
São Paulo - SP - Brasil
Telefone: (011) 3818-7259
Fax: 55-11-3818-7354-BR

Ilmo Sr. Dr. Maurício Seckler
Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Do Hospital Universitário da USP

At.: Processo 459/04

Prezado Doutor,

Devido à importância das infecções bacterianas em meningites agudas e pelo fato de estarmos desenvolvendo, em conjunto com a Enfermaria de Pediatria deste hospital, uma pesquisa longitudinal sobre meningites e meningoencefalites virais, vimos solicitar a alteração do projeto inicial de modo a incluir o diagnóstico bacteriológico, com técnicas de biologia molecular para identificação dos agentes etiológicos. Este diagnóstico bacteriológico será feito sob a responsabilidade da Dra. Marina Barquerizo Martinez do Laboratório Clínico do HU.

Deste modo, solicitamos a troca do nome inicial do projeto de pesquisa "Aplicação de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) no diagnóstico rápido de vírus neurotrópico" para **"Aplicação de técnicas de biologia molecular no diagnóstico rápido de infecções do sistema nervoso central."**
Em anexo, encaminhamos novo termo de consentimento pós-informação.

Atenciosamente,

Dra. Charlotte Marianna Hársi

hospital universitário
universidade de são paulo

Fls. nº 110
Rubrica tr

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I. Identificação do paciente

Nome: _____

Responsável: _____

II. Dados da pesquisa

Estamos realizando uma pesquisa no Hospital Universitário, em conjunto com o Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sobre meningites virais e bacterianas.

As meningites podem ter várias causas. Entre as mais frequentes, estão as infecções por vírus ou bactérias. Os exames mais comuns realizados no líquido ("líquido da espinha") nem sempre conseguem definir que a causa da meningite. Quando há dúvida, o paciente permanece internado, e recebe antibióticos, para não correr riscos, porque as meningites por bactéria são geralmente mais graves, e necessitam tratamento com antibiótico injetável.

Como seu (sua) filho (a) tem suspeita clínica de meningite, ele (a) necessita da coleta de líquido, para este diagnóstico ser concluído. Vários exames são realizados no líquido, para definir a causa da meningite. Os testes que esta pesquisa irá realizar podem auxiliar no diagnóstico de meningite bacteriana ou viral, o que pode contribuir com menos internações, e menor necessidade de tratamento com antibióticos. Não há nenhum risco relacionado com esta pesquisa para seu (sua) filho (a). Durante a coleta obrigatória de líquido serão colhidos mais 2 ml para a realização da pesquisa. Na coleta de sangue, que é realizada de rotina, para pacientes com suspeita de meningite, serão colhidos mais 2 ml deste material, na mesma punção, para serem usados na pesquisa. Os exames para identificação de vírus ou bactérias serão realizados nestas amostras.

Declaramos que:

1. Poderá haver acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Poderá ser retirado seu consentimento a qualquer momento e a criança poderá deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da sua assistência.
3. Será salvaguardada sua confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Haverá disponibilidade de assistência no HU, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

III. Pesquisadores responsáveis:

Dra Selma Lopes Betta Ragazzi

Médica responsável pela Enfermaria de Pediatria do Hospital Universitário – USP.

Endereço: Hospital Universitário - USP, Enfermaria de Pediatria, telefone: 3039-9409.

Prof. Dra Charlotte Marianna Hársi

Professora Doutora do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Instituto de Ciências Biomédicas – USP, telefone: 3091-7557

Prof. Dra. Marina Baquerizo Martinez

Professora Associada da Faculdade de Farmácia da USP e

Laboratório Clínico do hospital Universitário

IV. Consentimento Pós-esclarecimento

Declaro que após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa. Estou ciente que posso recusar esta participação, o que não implicará em mudanças no tratamento do meu/minha filho/filha.

São Paulo, ____ de _____, _____.

Assinatura do responsável pelo paciente:

Assinatura do pesquisador: