

Validação da técnica de contraimunoeletroforese (CIE) para o diagnóstico laboratorial das meningites causadas por *Neisseria meningitidis* sorogrupos A, B, C e W135

Validation of the counterimmunoelectrophoresis assay for laboratory diagnosis of meningitis caused by Neisseria meningitidis serogroups A, B, C and W135

Lucila Okuyama Fukasawa^I, Maristela Marques Salgado^I, Eneida G. Lemes Marques^{II}, Rachel M.B.P. Fernandes^{III}, Brigina Kemp^{IV}, Telma Regina Carvalhanas^V, Lee H. Harrison^{VI}, Cláudio Tavares Sacchi^I e Grupo de Trabalho das Meningites Bacterianas^{VII}

^ICentro de Imunologia. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

^{II}Centro de Laboratório Regional de Campinas. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. Campinas, SP, Brasil

^{III}Centro de Controle e Prevenção de Doenças. COVISA. Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo, SP, Brasil

^{IV}Centro de Vigilância Epidemiológica. Secretaria Municipal de Saúde de Campinas, SP, Brasil

^VCentro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

^{VI}Departamento de Epidemiologia. Faculdade de Saúde Pública e de Medicina. Universidade de Pittsburgh. Pittsburgh, PA, Estados Unidos

^{VII}Grupo de Trabalho das Meningites Bacterianas

RESUMO

A contraimunoeletroforese (CIE) é uma técnica amplamente empregada no Brasil para o diagnóstico laboratorial indireto das meningites causadas por *Neisseria meningitidis* (Men) dos sorogrupos A, B, C e W135 ou *Haemophilus influenzae* sorotipo b (Hib). O objetivo deste trabalho foi validar a CIE empregando-se 301 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e 236 amostras de soro de pacientes com suspeita de meningite bacteriana dos municípios de São Paulo e Campinas no período de 4 de junho de 2007 a 30 de maio de 2009. Em amostras de LCR, a CIE apresentou sensibilidade de 62,7% (42/67) (IC 95%, 50%-74,2%) e especificidade de 88,9% (208/234) (IC 95%, 84,1%-92,6%) para a detecção de Men. Em soro, a sensibilidade foi de 35,3% (6/17) (IC 95%, 14,2%-61,7%) e a especificidade de 90,9% (199/219) (IC 95%, 86,3%-94,4%) Estes mesmos parâmetros não foram calculados para o componente Hib, devido à indisponibilidade de número significativo de amostras com cultura positiva para esta bactéria. Os resultados demonstraram que a técnica de CIE, embora tenha apresentado alta especificidade, apresentou baixa sensibilidade, especialmente em amostras de soro; assim, o uso da CIE não é recomendado como teste único para o diagnóstico das meningites bacterianas. Portanto, ressalta-se a necessidade do emprego de outros testes indiretos com alta sensibilidade e especificidade, como a PCR em tempo real, para a melhoria do diagnóstico e do sistema de vigilância da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Contraimunoeletroforese, Validação. Diagnóstico Laboratorial. Meningites Bacterianas. *Neisseria meningitidis*

ABSTRACT

Counterimmunoelectrophoresis (CIE) is widely used in Brazil for non-culture diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis* (Men) of serogroups A, B, C, W135 or *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib). The objective of this study was to validate CIE using 301 samples of cerebrospinal fluid (CSF) and serum samples from 236 patients with suspected bacterial meningitis in the cities of São Paulo and Campinas during the period comprised between June 4th, 2007 to May 30th, 2009. In CSF specimens, CIE had a sensitivity of 62.7% (42/67) (95% CI, 50%-74.2%) and specificity of 88.9% (208/234) (95% CI, 84.1% -92.6%) for the detection of Men. In serum, the sensitivity was 35.3% (6/17) (95% CI 14.2% -61.7%) and specificity 90.9% (199/219) (95% CI, 86.3% -94.4%). These parameters were not calculated for the Hib component, due to the unavailability of a significant number of samples with positive culture for this bacterium. Our results showed that the CIE assay although having relatively high specificity, showed low sensitivity, especially in serum samples, indicating that CIE is not recommended as the only diagnostic test for bacterial meningitis. Additionally, it reflects the need of the use of other non-culture tests with high sensitivity and specificity, such as real-time PCR to improve both clinical and the public health surveillance system.

KEY WORDS: Counterimmunoelectrophoresis. Validation. Laboratory Diagnosis, Bacterial Meningitidis. *Neisseria meningitidis*

INTRODUÇÃO

A contraimunoelctroforese (CIE) ou imunoelctroforese cruzada (IEC) é uma técnica simples e rápida empregada para a detecção de antígenos bacterianos em amostras biológicas, tais como soro, líquido cefalorraquidiano (LCR) e urina. Em 1971, Greenwood *et al*¹ verificaram que polissacarídeos da cápsula de *Neisseria meningitidis* (Men) presentes no LCR de pacientes, quando submetidos à passagem de corrente elétrica contínua, migravam para o pólo positivo e formavam uma linha de precipitação quando encontravam com seus anticorpos específicos, evidenciando a presença da bactéria nestas amostras clínicas. Na mesma época, Edwards² empregou esta mesma técnica para detectar a

presença de Men em amostras de soro de pacientes com meningococemia fulminante. Posteriormente, outros grupos passaram a empregar a CIE para o diagnóstico de infecções causadas pela *N. meningitidis*.^{3,4}

No Brasil, no começo da década de 70, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) padronizou um ensaio de CIE para o diagnóstico laboratorial indireto das meningites causadas pelo meningococo dos sorogrupos A, B e C, em decorrência das duas grandes epidemias de doença meningocócica que acometeram o País em 1971 e 1974.⁵⁻⁷ Posteriormente, foram incorporados ao ensaio, os componentes para a detecção do *Haemophilus influenzae* sorotipo b (Hib) e do meningococo

W135. Desde então, o ensaio de CIE tem sido empregado na rotina diagnóstica das meningites bacterianas em toda a rede de laboratórios do IAL que compreende o Laboratório Central, localizado no município de São Paulo, e 12 Centros de Laboratórios Regionais distribuídos no Estado de São Paulo. Adicionalmente, o ensaio de CIE também tem sido empregado em 20 dos 27 Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) do Brasil.

No ano de 2007, o IAL padronizou e implantou em sua rotina diagnóstica um ensaio de PCR em tempo real (PCR-TR) para a detecção simultânea de Men, *H. influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* (Spn),^{8,9} concomitantemente à implantação do Programa Sentinela de Vigilância Epidemiológica das Meningites Bacterianas pelo Centro de Vigilância Epidemiológica/Coordenadoria de Controle de Doenças/Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP). Durante o período de junho de 2007 a março de 2009, amostras de LCR e/ou soro de pacientes com suspeita de meningite bacteriana provenientes das unidades sentinelas do município de São Paulo e Campinas foram analisadas pelo ensaio de CIE, sendo seus resultados comparados com os da cultura e da PCR-TR para fins de validação do ensaio.

O presente trabalho teve como objetivo validar o ensaio de CIE determinando-se seus parâmetros de sensibilidade e especificidade.

METODOLOGIA

Foram analisadas 537 amostras de pacientes do município de São Paulo e Campinas, sendo 301 de LCR e 236 de soro armazenadas no Laboratório de Meningites Bacterianas do IAL. Estas

amostras eram de pacientes com suspeita de meningite bacteriana, com LCR com ≥ 100 leucócitos/mm³ e com $\geq 60\%$ de neutrófilos ou de pacientes com cultura de LCR e/ou hemocultura positiva para *N. meningitidis*. No presente trabalho, empregamos dados secundários, cuja fonte foi a base de dados do IAL e do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) relativos ao período de 4 de junho de 2007 a 30 de maio de 2009. Os dados deste trabalho foram provenientes de projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e pela Conep (protocolo nº 1827, parecer 854/09).

Contraímunoeletroforese (CIE) – A CIE foi realizada em fita de acetato de celulose (Cellogel, Malta, Itália) empregando-se antissoros policlonais contra Men A, B, C e W135 produzidos em cavalos ou carneiros pelo Instituto Adolfo Lutz. A corrida eletroforética ocorreu em tampão de Tris-Acetato 0,05 M, pH 8,6 por 10 minutos a 200 V. Após a corrida, as fitas foram lavadas com solução salina 0,85% (p/v), coradas com solução de Ponceau S 0,5% (p/v) por 5 minutos e descoradas com solução de ácido acético 5% (v/v).^{10,11}

Extração de DNA – A extração de DNA de LCR ou soro foi realizada utilizando-se o kit comercial QIAamp DNA Blood mini kit (Qia-gen), conforme orientação do fabricante, com exceção do volume de LCR empregado na extração, que passou a ser de 500µL.

PCR em tempo real (PCR-TR) – A reação de PCR-TR foi realizada em formato triplex para a detecção simultânea de Men (gene alvo, *ctrA*), Spn (gene alvo, *lytA*) e Hi (gene alvo, *bexA*). Todas as reações de PCR-TR foram preparadas com sistema TaqMan[®], em volume final de 25µL, utilizando-se 5µL do DNA alvo.^{8,9}

Análise dos dados – para o cálculo da sensibilidade e especificidade da CIE nas amostras de LCR e soro foram empregadas como padrão-ouro, amostras positivas para Men pela técnica de cultura. Os cálculos de sensibilidade e especificidade foram realizados empregando-se uma tabela do tipo 2x2, de acordo com as seguintes fórmulas:

- **Sensibilidade** – capacidade do teste em detectar a doença quando ela está presente ($a/a+c$), onde (a) representa o número de verdadeiros positivos e (c) o número de falsos negativos
- **Especificidade** – capacidade do teste em afastar a doença quando ela está ausente ($d/b+d$), em que (d) representa o número de verdadeiros negativos e (b) o número de falsos positivos.

Para determinar se amostras com CIE positiva, mas com cultura negativa representariam falsos positivos, testamos estas amostras por PCR-TR para confirmação dos resultados.

RESULTADOS

Validação da CIE em amostras de LCR

Foram empregadas 301 amostras de LCR, sendo que 67 foram positivas para *N. meningitidis* pela cultura. A sensibilidade da CIE para a detecção de Men foi de 62,7% (42/67) (intervalo de

confiança, IC, de 95%, 50%-74,2%). A especificidade foi de 88,9% (208/234) (IC 95%, 84,1%-92,6%) (Tabela 1).

Entre os espécimes de LCR analisados, tivemos 26 amostras com cultura negativa que foram positivas para Men pela CIE. Para verificar se estes resultados seriam falsos positivos, submetemos estas mesmas amostras de LCR ao ensaio de PCR-TR para confirmação dos resultados da CIE. Nós observamos que 96,2% (25/26) destas amostras puderam ser confirmadas para Men pelo ensaio de PCR-TR.

Validação da CIE em amostras de soro

Empregamos 236 amostras de soro, sendo que 17 foram positivas para *N. meningitidis* pela cultura. A sensibilidade da CIE para *N. meningitidis* em amostras de soro foi de 35,3% (6/17) (IC 95%, 14,2%-61,7%) e a especificidade foi de 90,9% (IC 95%, 86,3%-94,4%) (199/219) (Tabela 1).

Entre as 20 amostras de soro com cultura negativa, mas com CIE positiva para Men, 60% (12/20) também foram confirmadas para este mesmo agente pelo ensaio de PCR-TR.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, validamos o ensaio de CIE padronizado pelo IAL para a detecção de meningococos dos sorogrupos A, B, C, W135 em amostras de LCR e soro. Não foi possível calcular

Tabela 1. Determinação da sensibilidade e especificidade do ensaio de contraímunoelctroforese para a detecção de *Neisseria meningitidis* sorogrupos A, B, C, W135 em amostras de líquido cefalorraquidiano e soro.

Amostra clínica	Sensibilidade			Especificidade		
	Sensibilidade	Nº testado	IC 95%	Especificidade	Nº testado	IC 95%
LCR	62,7%	67	50,0-74,2	88,9%	234	84,1-92,6
Soro	35,3%	17	14,2-61,7	90,9%	219	86,3-94,4

IC – intervalo de confiança

os parâmetros de sensibilidade e especificidade para o componente Hib, pois não obtivemos um número significativo de amostras com cultura positiva para esta bactéria.

Os dados de nosso trabalho mostraram que a CIE, embora tenha apresentado uma alta especificidade (em torno de 90%), apresentou baixa sensibilidade, especialmente em amostras de soro. Nossos dados corroboram com os publicados por Pires e Reis Filho em que a CIE apresentou sensibilidade de 44,4% e especificidade de 98,58% para detecção de Men em amostras de LCR.¹² Concordando com este trabalho, Tilton *et al* demonstraram que a CIE foi capaz de detectar 44,4% das amostras com cultura positiva para Men.¹³ Colding e Lind também demonstraram baixa sensibilidade da CIE (54,7%) para detecção do meningococo em líquido.¹⁴ Da mesma forma, trabalho publicado por Hoban *et al* demonstrou que a CIE apresentou uma sensibilidade e especificidade de 50% para detecção de Men.¹⁵ Outros estudos relataram sensibilidades maiores, entre 75% e 77%, embora estes valores refiram-se à sensibilidade total da CIE para a detecção do meningococo, pneumococo e Hib, não sendo calculado este parâmetro separadamente para cada bactéria.^{10,11}

Embora a CIE tenha apresentado baixa sensibilidade em relação à cultura, este ensaio detectou adicionalmente o meningococo em 26 amostras de LCR e em 20 de soro com culturas negativas. Destas, 96,2% (25/26) das amostras de LCR e 60% (12/20) das de soro são provavelmente positivos verdadeiros pelo ensaio de CIE, pois também foram positivas para *N. meningitidis* pelo ensaio de PCR-TR. Oito amostras de soro e uma amostra de LCR, negativas pela cultura e PCR-TR, mas positivas

para Men pela CIE são provavelmente resultados falso positivos dessa técnica.

Ainda que a CIE tenha apresentado uma especificidade em torno de 90%, como esta técnica emprega antissoros policlonais, existe a possibilidade de ocorrer reatividade cruzada com bactérias com similaridade antigênica de seus polissacarídeos capsulares. Em estudo anterior, demonstramos que 57% das amostras de LCR ou soro com resultado positivo para Hib pela CIE eram falsos positivos, não sendo confirmados pelas técnicas de PCR-TR, teste de aglutinação do látex e/ou cultura, os quais indicaram que 81% destas amostras foram positivas para *Streptococcus pneumoniae*.¹⁶

Embora a CIE seja simples e de baixo custo, o que a torna atrativa para rotinas diagnósticas em laboratórios públicos de saúde pública, esse ensaio apresenta menor sensibilidade que outras técnicas indiretas como o teste de látex ou PCR-TR. A possibilidade de ocorrência de reatividades cruzadas também reflete a necessidade de uma análise cuidadosa deste ensaio para evitar a liberação de resultados falsos positivos. Diante deste cenário e com o advento de técnicas mais modernas, como a PCR-TR, a tendência para os próximos anos é que todos os LACEN substituam o ensaio de CIE pela PCR-TR para o diagnóstico indireto das meningites bacterianas como ocorreu com o IAL Central em 2010. Até o presente momento, oito dos 20 LACEN que realizam a CIE já foram capacitados no ensaio de PCR-TR e devem, em curto prazo, realizar esta substituição.

AGRADECIMENTOS

À Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, ao National Institute of Allergy and Infectious Diseases [K24 AI52788 (Dr. Harrison)] e ao

Fogarty International Center Global Infectious Diseases Research Training Program Grant, National Institutes of Health [D43TW006592 (University of Pittsburgh)] pelo financiamento do trabalho.

GRUPO DE TRABALHO

Grupo de Trabalho das Meningites Bacterianas: Departamento de Epidemiologia. Faculdade de Saúde Pública e de Medicina. Universidade de Pittsburgh. Pittsburgh, PA, Estados Unidos: Kathleen A. Shutt; Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil: Ana F. Ribeiro, Ricardo K. Albernaz, Vera Malheiro; ^{III}Centro de Controle e Prevenção de Doenças. COVISA. Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo, SP, Brasil: Rosa M. D. Nakazaki; Centro de Imunologia. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil: Maria Gisele Gonçalves, Fábio Takenori Higa, Anna Vera Custódio, Terezinha Pereira de Araújo; Centro de Bacteriologia. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil: Maria Cecília O. Gorla, Maria Cristina C. Brandileone, Rosemeire Cobo Zanella, Ana Paula Silva de Lemos, Maria Luiza L. S. Guerra, Conceição Martins da Costa Zanelato, Marta Galhardo; Departamento de Saúde Internacional. Faculdade

de Saúde Pública Johns Hopkins Bloomberg. Baltimore, Maryland, Estados Unidos: Angela Cruciano; Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil: Eliseu A. Waldman; Instituto da Criança. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil: Sonia R. T. da Silva Ramos; Instituto de Infectologia Emílio Ribas. São Paulo, SP, Brasil: Célia E. Guarnieri, Simone A. de Souza; Casa de Saúde Santa Marcelina. São Paulo, SP, Brasil: Marcelo Maki, Fabio Valdetaro; Hospital da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. SP, Brasil: Maria J. P. Rujula, Elza L. U. Vicentine; Hospital Estadual Regional Sul. São Paulo, SP, Brasil: Sueli Rosenfeld, Elaine Magalhães; Hospital Estadual do Mandaqui. São Paulo, SP, Brasil: Fabio Rossi, Marília V. Nogueira; Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil: Katsumi Osiro, Eliete A. M. Frigatto; Hospital Municipal Cármino Caricchio. São Paulo, SP, Brasil: Juang H. Jyh, Regina M. Loda; Hospital Municipal Infantil Menino Jesus. São Paulo, SP, Brasil: Walter B. G. Amorin; Hospital Estadual do Grajaú. São Paulo, SP, Brasil: Marcia C. de Araújo, Rossini Modesto; Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas. Campinas, SP, Brasil: Veronica M. Sincok, Carlos E. Levy; Hospital Celso Pierro da Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Campinas, SP, Brasil: Elizabete A. Russi, Nereide A. B. Badur; Hospital Municipal Mario Gatti. Campinas, SP, Brasil: Ricardo A. Cocolisce, Rogério A. Kuboyama.

REFERÊNCIAS

1. Greenwood BM, Whittle HC, Dominic-Rajkovic O. Counter-current immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *Lancet*. 1971;2(7723):519-21.
2. Edwards EA. Immunological investigations of meningococcal disease. I. Group-specific *Neisseria meningitidis* antigens presented in the serum of patients with fulminant meningococemia. *J Immunol*. 1971;106(2):314-7.
3. Coonrod JD, Rytel MW. Determination of aetiology of bacterial meningitis by counter-immunoelectrophoresis. *Lancet*. 1972;1(7761):1154-7.
4. Hoffman TA, Edwards EA. Group-specific polysaccharide antigen and humoral antibody response in disease due to *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis*. 1972;126(6):636-44.
5. Palhares M, Gelli DS, Almeida MCR, Mellis CEA, Takeda AK, Taunay AE. Pesquisa de polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* do grupo C no líquido cefalorraquidiano por imunoelctroforese cruzada em acetato de celulose. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1973;33:85-9.
6. Requejo HIZ. A meningite meningocócica no mundo. São Paulo: Edições Inteligentes; 2004.
7. Fonseca C, Moraes JC, Barata RB. O livro da meningite, uma doença sob a luz da cidade. São Paulo: Segmento Farma; 2004.
8. Instituto Adolfo Lutz, Seção de Imunologia, Laboratório de Meningites Bacterianas. Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz. *BEPA. Bol. Epidemiol. Paul*. 2007;4(40):24-7.
9. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, et al. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011;6(6):1-8.
10. Requejo HI, Nascimento CM, Fahrat CK. Comparison of counterimmunoelectrophoresis, latex agglutination and bacterial culture for the diagnosis of bacterial meningitis using urine, serum and cerebrospinal fluid samples. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25(4):357-67.
11. Alkmin MGA, Landgraf IM, Vieira MFP, Camargo MCC, Gonçalves MIC. Diagnosis of bacterial meningitis and septicemia by serum counterimmunoelectrophoresis. *Braz J Med Biol Res*. 1995;28:1065-8.
12. Pires LA, Reis Filho JB. Contraimunoelctroforese no diagnóstico etiológico das meningites bacterianas. *HU Rev*. 1990;17(2):145-67.
13. Tilton RC, Dias F, Ryan RW. Comparative evaluation of three commercial products and counterimmunoelectrophoresis for the detection of antigens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. 1984;20(2):231-4.

14. Colding H, Lind I. Counterimmuno-electrophoresis in the diagnosis of bacterial meningitis. *J Clin Microbiol.* 1977;5(4):405-9.
15. Hoban DJ, Witwicki E, Hammond GW. Bacterial antigen detection in cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1985;3(5):373-9.
16. Fukasawa LO, Salgado MM, Gonçalves MG, Custódio AV, Araújo TP, Carvalhanas TRMP, *et al.* Limitações no uso da técnica de contraímuno-eletoforese (CIE) para o diagnóstico das meningites causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b. *BEPA. Bol. Epidemiol. Paul.* 2010;7(76):4-12.

Recebido em: 17/08/2011

Aprovado em: 25/06/2012

Correspondência/Correspondence to:

Lucila Okuyama Fukasawa
Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar
CEP: 01246-902 – São Paulo/SP – Brasil
Tel.: 55 11 3068-2899
E-mail: lucilaof@gmail.com