

## AValiação DO TESTE DE LÁTEX COMPARATIVAMENTE À CULTURA E À IMUNOELETROFORESE CRUZADA NO DIAGNÓSTICO DE MENINGITES BACTERIANAS\*

Maria das Graças Adelino ALKMIN\*\*  
Ilka Maria LANDGRAF\*\*  
Carmo Elias Andrade MELLES\*\*

RIALA 6/779

ALKMIN, M.G.A.; LANDGRAF, I.M. & MELLES, C.E.A. - Avaliação do teste de látex comparativamente à cultura e à imunoelectroforese cruzada no diagnóstico de meningites bacterianas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(1): 19-24, 1995.

**RESUMO:** Um total de 326 amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com evidência clínica de meningite foi estudado empregando-se um reagente de látex comercial para demonstrar a presença de antígenos bacterianos. As amostras de líquido cefalorraquidiano eram purulentas ou turvas e foram pesquisados antígenos de *Neisseria meningitidis*, grupos B e C, *Haemophilus influenzae* b e *Streptococcus pneumoniae*. Os resultados da detecção de antígenos bacterianos através do reagente de látex mostraram um melhor desempenho deste método em comparação à cultura para *Neisseria meningitidis* grupos B e C e para *Streptococcus pneumoniae*. Excluindo *Streptococcus pneumoniae*, para o qual não foi realizada a imunoelectroforese cruzada, o desempenho do látex mostrou-se superior à imunoelectroforese cruzada apenas para *Neisseria meningitidis* grupo B. A comparação de resultados do teste de látex com os obtidos através de culturas revelou índice máximo de sensibilidade para *Neisseria meningitidis* grupo B e para *Streptococcus pneumoniae*. Comparando os resultados com os obtidos de imunoelectroforese cruzada, os maiores níveis de sensibilidade foram observados para *Neisseria meningitidis* grupo B, e para *Haemophilus influenzae* b. Com relação à especificidade, os valores foram satisfatórios para todos os agentes bacterianos pesquisados, em relação aos outros dois métodos diagnósticos, exceção da imunoelectroforese cruzada para *Streptococcus pneumoniae* que não foi analisada. O índice de concordância Kappa (K) demonstrou melhores índices K para *Haemophilus influenzae* b quando comparado com a cultura, e melhores índices K também para este agente bacteriano e para *Neisseria meningitidis* grupo C, quando os resultados da aglutinação de látex foram comparados com o método de imunoelectroforese cruzada.

**DESCRITORES:** Meningites bacterianas, diagnóstico; aglutinação de látex; pesquisa de antígenos bacterianos no líquido cefalorraquidiano.

### INTRODUÇÃO

Meningites bacterianas constituem um problema de Saúde Pública no mundo. Estas meningites podem ser causadas por um grande número de bactérias. No entanto, após as 10 primeiras semanas de vida, as meningites causadas por *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* b e *Streptococcus pneumoniae* tornam-se prevalentes<sup>10</sup>.

Nas infecções bacterianas, a escolha correta do tratamento depende da demonstração exata do agente etiológico<sup>16</sup>.

Devido à diversidade de agentes causadores de meningites, se faz necessário o uso de técnicas capazes de estabelecer rapidamente o diagnóstico, mas dificuldades são encontradas na caracterização destes agentes. Exame bacterioscópico direto, através de coloração pelo método de Gram, oferece limitações quanto à interpretação. A cultura é lenta, necessitando de pelo menos 18 horas para crescimento<sup>7</sup>. Maiores dificuldades são encontradas no diagnóstico laboratorial, quando o material não é colhido e transportado de forma adequada, o que facilita a desintegração dos microorganismos e, desta forma, dificulta a interpretação do exame bacterioscópico e sobre-

\* Realizado na Seção de Imunologia e Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

maneira, o desenvolvimento em meios de cultura habituais. O uso de antibióticos de forma inadequada antes da internação pode prejudicar a interpretação de um esfregaço corado ou o crescimento do agente bacteriano em meios de cultura <sup>3,7,21</sup>.

Torna-se necessário introduzir métodos imunológicos para pesquisa de antígenos, associados a técnicas bacteriológicas clássicas. Através dos primeiros, a detecção do microorganismo é possível mesmo com a administração prévia de antibacterianos como medida de emergência, pois, como já descrito por Dochez & Overy <sup>9</sup>, as bactérias que mais frequentemente causam meningites liberam polissacarídes capsulares nos fluidos corpóreos durante a infecção.

Pesquisadores têm tentado encontrar métodos rápidos para demonstrar antígenos solúveis em fluidos biológicos de pacientes com meningites <sup>6</sup>.

A imunoeletroforese cruzada (IEC) tem sido usada amplamente para determinação da etiologia de diferentes doenças, sendo aceita junto aos métodos bacteriológicos padrões no diagnóstico das meningites bacterianas <sup>15</sup>. Outros métodos consistem na aglutinação de látex (LA) <sup>16</sup>, coaglutinação (COA) <sup>17,27</sup>, Dot-ELISA <sup>5</sup>, ELISA <sup>26</sup> e radioimunoensaio <sup>19</sup>. Os últimos dois métodos são demorados na realização e requerem equipamento especial, e tem sido registrado que a IEC é menos sensível do que LA e COA para alguns antígenos microbianos <sup>11,25,27,28</sup>.

Neste estudo foi avaliada a eficácia da aglutinação de látex na detecção de antígenos bacterianos no líquido cefalorraquidiano (LCR), empregando-se reagente de látex comercial, comparativamente aos métodos bacteriológico da cultura e imunológico da IEC.

## MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 326 amostras de LCR purulento ou turvo de pacientes com evidência clínica de meningite foi examinado através de métodos bacteriológicos e imunológicos.

Cada amostra de LCR foi examinada através de bacterioscopia direta empregando-se coloração de Gram modificado por Hucker, e cultivada em agar chocolate, sangue de coelho a 5% e base Mueller-Hinton, incubada a 36-37°C em atmosfera de 5-10% de CO<sub>2</sub> até 24-48 horas. Colônias foram identificadas como descrito previamente <sup>4</sup>.

Imunoeletroforese cruzada foi realizada em fita de acetato de celulose usando tampão barbital, pH 8,6, força iônica 0,05. A fonte foi ajustada para 30 mA e a corrida marcada para 10 minutos. A fita foi lavada em solução fisiológica a 0,85% e durante uma hora, trocando-se 10 vezes a solução. A coloração foi feita

com Ponceau S durante 5 minutos, e processada a descoloração com ácido acético a 5% <sup>4</sup>. Anti-soros a *N. meningitidis*, grupos A,B,C,Y,W<sub>135</sub> e a *H. influenzae b* foram produzidos no laboratório de Imunologia, seguindo metodologia descrita por Alexander <sup>1</sup> e Alkmin <sup>2</sup>, como também os antígenos polissacarídicos usados como controle <sup>14</sup>.

O teste de LA foi realizado utilizando-se reagentes gentilmente cedidos pela Biolab (Bio Mérieux, 69260 Charbonnières les Bains, France), seguindo-se as recomendações do fabricante. Estes reagentes constituem-se de partículas de látex sensibilizadas por anti-soros específicos, e, através de uma técnica de aglutinação em lâmina, é detectado o antígeno correspondente.

A sensibilidade e a especificidade do sistema de LA foram avaliadas através de metodologias já descritas <sup>12,13,18</sup>.

A presença de agentes antibacterianos em amostras de LCR foi detectada através de metodologia previamente descrita <sup>20</sup>.

## RESULTADOS

Os resultados da detecção de antígenos bacterianos no LCR através do reagente de LA Biolab estão expostos na Tabela 1 e demonstram melhor desempenho deste método comparativamente à cultura para o diagnóstico de *N. meningitidis*, grupos B e C. Considerando o *S. pneumoniae*, o LA mostrou-se ligeiramente superior à cultura, mas a IEC não foi realizada para a detecção deste antígeno circulante. O teste de LA mostrou-se superior à IEC apenas para *N. meningitidis* grupo B.

Na Tabela 2, observa-se que a sensibilidade do teste de LA para *N. meningitidis* grupo C, e para *S. pneumoniae* alcançou o nível máximo quando comparada com a cultura. Na comparação do último teste com a IEC, os valores máximos de sensibilidade foram observados para *N. meningitidis* grupo B, e para *H. influenzae b*, salientando-se, porém, que antígenos solúveis de *S. pneumoniae* não foram pesquisados através da IEC.

Com relação à especificidade, os valores alcançados foram elevados para as bactérias pesquisadas, quando os resultados foram analisados frente à cultura, excetuando-se *N. meningitidis* grupo B. Também foram obtidos valores elevados na avaliação frente à IEC para os outros agentes bacterianos.

O índice kappa (K), quando comparado com a cultura, demonstrou melhor grau de concordância para *H. influenzae b*. O teste de LA comparado com a IEC, apresentou o melhor grau de concordância K para este mesmo agente bacteriano e também para *N. meningitidis* grupo C.

A detecção da presença de antimicrobianos nas amostras de LCR revelou que uma porcentagem bastante elevada das amostras continha antimicrobianos (53,2%).

### DISCUSSÃO

Um diagnóstico específico de meningite causada por *N. meningitidis*, *H. influenzae b* ou *S. pneumoniae* oferece vantagens clínicas significativas para o direcionamento da terapia antimicrobiana e mesmo na projeção de uma eventual evolução da doença. Dentre os métodos imunológicos, tem sido empregada a IEC para detectar antígenos no LCR.

O presente estudo do emprego do LA mostrou ser este método mais sensível do que a cultura para detectar *N. meningitidis*, principalmente do grupo B e *S. pneumoniae*. Outros autores, como Tilton et alii<sup>28</sup>, testaram reagentes de LA de procedências diferentes, Bactigen e Directigen, e, embora pesquisando também antígenos de *N. meningitidis* grupo B, relatam que o LA apresentou melhor desempenho do que cultura em relação ao *S. pneumoniae* e *H. influenzae b* frente ao primeiro dos reagentes testados, e superioridade sobre cultura em relação ao *S. pneumoniae* no emprego do segundo dos reagentes testados.

Observamos resultados do LA superiores aos da IEC quando antígenos polissacarídicos de *N. meningitidis*, grupo B, foram pesquisados, como também observado por Tilton et alii<sup>28</sup>, e Requejo et alii<sup>23</sup>. No entanto, Dirks-Go & Zanen<sup>8</sup> e Whittle et alii<sup>29</sup> alcançaram resultados semelhantes entre estes dois métodos imunológicos de diagnóstico ao pesquisarem este mesmo antígeno bacteriano, e também de outros grupos de *N. menin-*

*gitudis*, de *H. influenzae b* e de *S. pneumoniae*, embora estes últimos autores não tenham analisado separadamente os sorogrupos de meningococos.

Resultados mais recentes que comprovam melhor desempenho dos reagentes de LA demonstram um aprimoramento destes reagentes nos últimos 20 anos.

Vários pesquisadores fizeram referência à interferência de antibacterianos presentes em amostras de LCR no diagnóstico etiológico de meningites bacterianas<sup>21,22,24</sup>. Embora o número de bactérias seja prejudicado com uma terapia antibiótica já estabelecida, técnicas de imunodeteção de antígenos bacterianos podem conduzir a resultados positivos em amostras de LCR colhidas vários dias após iniciada a antibioticoterapia<sup>25</sup>.

Neste estudo, a detecção da presença de antimicrobianos em grande número das amostras de LCR estudadas, pode explicar a relativa baixa positividade observada em todos os exames diagnósticos realizados.

Embora tenha sido observado que na fase inicial da doença antígenos bacterianos podem não estar ainda presentes no LCR, conduzindo a um teste imunológico negativo, dentre as técnicas de imunodiagnóstico, o teste de LA apresenta a vantagem da rapidez e simplicidade na realização, sem necessidade de equipamentos especiais<sup>22</sup>.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Ana Vera Custódio e José de Jesus Chaves Nunes pela colaboração na realização dos testes de imunoelctroforese cruzada.

TABELA 1

Resultados da cultura e da pesquisa de antígenos circulantes através da imunoelctroforese cruzada e do reagente de látex Biolab em amostras de líquido cefalorraquidiano.

Bactérias	Nº. de amostras positivas/nº de amostras testadas (%)		
	Cultura	Imunoelctroforese cruzada	Látex
<i>Neisseria meningitidis</i>			
Grupo B	31/220(14,1)	44/238(18,5)	60/268(23,4)
Grupo C	4/142(2,8)	7/65(10,8)	11/219(5,2)
<i>Haemophilus influenzae b</i>	30/152(19,7)	31/91(34,1)	34/242(14,0)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	9/171(5,3)	NR	13/221 (5,9)

NR = Não realizado

TABELA II

Valores de sensibilidade e especificidade do teste de látex Biolab no diagnóstico de meningites bacterianas em relação à cultura e à imunoelctroforese cruzada.

Métodos	Bactérias	Sensibilidade	Látex	Especificidade	Índice Kappa (k)	Conceito k	Z <sub>0</sub> <sup>1</sup>
Cultura	<i>N. meningitidis</i> grupo B	0,838 (n=0,689-0,924)	0,787(n=0,722- 0,840)	0,461	Moderado	3,105	
	grupo C	1,000 (n=0,439-1,000)	0,971(n=0,928 -0,989)	0,587	Moderado	0,966	
	<i>H. influenzae b</i>	0,938 (n=0,799-0,983)	0,971(n=0,929 -0,991)	0,902	Quase perfeito	4,497	
	<i>S. pneumoniae</i>	1,000 (n=0,723-1,000)	0,935 (n=0,877 -0,967)	0,790	Substancial	1,289	
Imunoelctroforese cruzada	<i>N. meningitidis</i> grupo B	0,978 (n=0,884-0,996)	0,850 (n=0,793 -0,893)	0,668	Substancial	4,706	
	grupo C	0,875 (n=0,529-0,978)	0,982 (n=0,907 -0,996)	0,857	Quase perfeito	1,939	
	<i>H. influenzae b</i>	0,912 (n=0,770-0,970)	0,930 (n=0,833 -0,972)	0,837	Quase perfeito	5,044	

Z<sub>0</sub><sup>1</sup> = Z observado (Z= crítico = 1,96 para nível de 0,05). Referências 12, 13 e 18.

RIALA6/779

ALKMIN, M.G.A.; LANDGRAF, I.M & MELLES, C.E.A. - Evaluation of latex agglutination test in comparison to culture and counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of bacterial meningitis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(1):19-24, 1995.

ABSTRACT: About 326 cerebrospinal fluid samples of patients with clinical signs of meningitis were studied through a commercial latex reagent for bacterial antigen detection. The purulent cerebrospinal fluid samples were analysed for *Neisseria meningitidis* groups B and C, *Haemophilus influenzae b*, and *Streptococcus pneumoniae* antigens. The results showed a better performance of the latex agglutination test in comparison to culture for *Neisseria meningitidis* group B and group C, and for *Streptococcus pneumoniae*. Except for *Streptococcus pneumoniae* which was not tested through counterimmunoelectrophoresis, the latex reagent had better performance than counterimmunoelectrophoresis only for *Neisseria meningitidis* group B. Sensitivity of latex test, as compared with culture, showed highest levels for *Neisseria meningitidis* group B, and for *Streptococcus pneumoniae*. When latex test results were compared with counterimmunoelectrophoresis ones, highest levels of sensitivity were observed for *Neisseria meningitidis* group B and *Haemophilus influenzae b*. Concerning specificity, fair values were observed for all bacterial agents relating to culture, and for all but *Streptococcus pneumoniae* which was not tested for counterimmunoelectrophoresis; fair values were also observed when the results of this method were considered. The degree of kappa agreement (k), when compared with culture, exhibited better K indices for *Haemophilus influenzae b*, and better K indices for this bacterial agent and for *Neisseria meningitidis* group C as well, when the results of latex agglutination test were compared with counterimmunoelectrophoresis method.

DESCRIPTORS: Bacterial meningitis, diagnosis; latex agglutination; bacterial antigens in cerebrospinal fluid.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, H. - Procedure for immunization of horses or burros for production of anti-meningococcal serum. *Proc. Exp. Soc. Biol. Med.*, 40: 313-314, 1939.
- ALKMIN, M.G.A.; SHIMIZU, S.H.; LANDGRAF, I.M; GASPARI, E.N. & MELLES, C.E.A. Production and immunochemical characterization of *Neisseria meningitidis* group B antiserum for the diagnosis of purulent meningitis, Brazilian. *J. Med. Biol. Res.*, 27: 1627-1634, 1994.
- BASTOS, C.O.; TAUNAY, A.E.; GALVÃO, P.A.A.; TIRIBA, A.C.; SARAIVA, P.A.; CASTRO, I. O. & LOMAR, A.V. - Meningites: considerações sobre 15.607 casos internados no Hospital Emílio Ribas durante o quinquênio 1958-1972. Ocorrência etiológica e letalidade. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 451-456, 1973.
- BRASIL, Divisão Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. *Normas técnicas para o diagnóstico das meningites bacterianas*. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 49p. (Série A: Normas e Manuais Técnicos, 32), 1986.

5. COLL, P.; BORCHE, L.; AUSINA, V.; MIRELIS, B. & PRATS, G. - Dot-Immunobinding assay with a monoclonal antibody for detection of group B meningococcal antigen. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 5: 44-46, 1986.
6. COONROD, J.D. & RYTEL, M.W. - Determination of aetiology of bacterial meningitis by counterimmunoelectrophoresis. *Lancet*, 1: 1154-1157, 1972.
7. DENIS, F.; PRINCE-DAVID, M.; SAULNIER, M.; TERROT, C.; CADOZ, M.; CHIRON, J.P. & DIOPMAR, I. - Test d'agglutination avec latex et contreimmunoelectrophorèse dans le diagnostic des méningites à *Haemophilus influenzae*. *Pathol. Biol.*, 31:97-101, 1983.
8. DIRKS-GO, S.I.S. & ZANEN, H.C. - Latex agglutination, counterimmunoelectrophoresis, and protein A co-agglutination in diagnosis of bacterial meningitis. *J. Clin. Pathol.* 31: 1167-1171, 1978.
9. DOCHEZ, AR & OVERY, O.T. - The elaboration of specific soluble substance by pneumococcus during growth, *J. Exp. Med.*, 26:447-493, 1917.
10. EMIL, C & GOTSCHLICH, M.D. - Bacterial meningitis: The beginning of the end. *Am. J. Med.*, 65:719-721, 1978.
11. FASOLA, E. & FERRIERI, P. - Laboratory diagnostic methods for central nervous system infections. *Neurosurg. Clin. North Am.* 3: 279-290, 1992.
12. FLEISS, J.L. - *Statistical methods in rates and proportions*. New York, Wiley, 1981.
13. FEINSTEIN, A.R. - Clinical epidemiology. In: The architecture of clinical research. Philadelphia, W.B. Saunders, Co. 1985, p. 185-186.
14. GOTSCHLICH, E.C.; LIU, T.Y. & ARNSTEIN, M.S. - Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and group C meningococcal polysaccharides. *J. Exp. Med.*, 129: 1349-1365, 1969.
15. GREENWOOD, B.M; WHITTLE, H.C. & DOMINIC-RAJKOVIC, O. - Countercurrent immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *Lancet*, 2:519-521, 1971.
16. KALDOR, J.; ASZNOWICZ, R. & BUIST, D. G. P. - Latex agglutination in diagnosis of bacterial infections, with special reference to patients with meningitis and septicemia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 68:284-289, 1977.
17. KOBELT, R & SCHAAD, U.B. - Prospective evolution of coagglutination and latex agglutination in the diagnosis of bacterial meningitis in children. *Medizinsche Universitates - Kinderklinik, Inselspital*, ch-3010 Bern SWI-Schweiz, 116/14. *Med. Wochenschr.*, p. 431-440, 1986.
18. MACCLURE, M & WILLET, D.W. - Misinterpretation and misuse of the kappa statistic. *Am. J. Epidemiol.* 126: 161-169, 1987.
19. MAYA, L. & KAYTHY, H. - Comparison of counter-current, immunoelectrophoresis, latex agglutination, and radioimmunoassay in detection of soluble capsular polysaccharide antigens of *Haemophilus influenzae* type b, and *Neisseria meningitidis* of groups A or C, *J. Clin. Pathol.*, 31:1172-1176, 1978.
20. MELLES, C.E.A; LEE, I.M.L & TAUNAY, A.E. - Pesquisa de antimicrobianos no líquido cefalorraquidiano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 44: 155-159, 1984.
21. MELLES, C.E.A.; LANDGRAF, I.M. & BARATA, R.C.B. - Meningites bacterianas I. Interferência de antibacterianos presentes no líquido cefalorraquidiano no diagnóstico etiológico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48:43-47, 1988.
22. MORENO-CARVALHO, O.A.; LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R. & SPINA-FRANÇA, A. - Provas de aglutinação do látex cefalorraquidiano em meningites bacterianas. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo), 46: 365-368, 1988.
23. REQUEJO, H.I.Z.; NASCIMENTO, C.M.P.C. & FAHRAT, C.K. - Comparison of counterimmunoelectrophoresis, latex agglutination and bacterial culture for the diagnosis of bacterial meningitis using urine, serum and cerebrospinal fluid samples. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 25: 357-367, 1992.
24. ROTHROCK, S.G.; GREEN, S.M.; WREN, J.; LETAL, D.; DANIEL UNDERWOOD, L. & PILLAR, E. - Pediatric bacterial meningitis: is prior antibiotic therapy associated with an altered clinical presentation? *Ann. Emerg. Med.*, 21: 146/51-152/57, 1992.
25. SEVERIN, W.P.J. - Latex agglutination in the diagnosis of meningococcal meningitis. *J. Clin. Pathol.* 25:1079-1082, 1972.

26. SIPPEL, J.E. & VOLLER, A. - Detection of *Neisseria meningitidis* cell envelope antigen by enzymelinked immunosorbent assay in patients with meningococcal disease. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 74: 644-648, 1980.
27. THIRUMOORTHY, M.C. & DAJANI, A.S. - Comparison of staphylococcal coagglutination, latex agglutination, and counterimmuno electrophoresis for bacterial antigen detection. *J. Clin. Microbiol.* 9: 28-32, 1979.
28. TILTON, R.C.; DIAS, F & RYAN, R.W. - Comparative evaluation of three commercial products and counterimmuno electrophoresis for the detection of antigens in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 20:231-234, 1984.
29. WHITTLE, H. C.; TUGWELL, P.; EGLER, L. J. & GREENWOOD, B. M. - Rapid bacteriological diagnosis of pyogenic meningitis by latex agglutination. *Lancet*. 14: 619-621, 1974.

*Recebido para publicação em 19/07/94*