

DETECÇÃO DE ANTÍGENOS POLISSACARÍDICOS CAPSULARES E TIPAGEM DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO PELA CONTRAIMUNOELETROFORESE *

Raquel Bellinati Robert PIRES **
Augusta Kiyomi TAKEDA **
Carmo Elias Andrade MELLES **
Augusto de Escragnolle TAUNAY **

RIALA6/538

PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A.E. — Detecção de antígenos polissacarídicos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em líquido cefalorraquidiano pela contraímuno-elektroforese. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 42(1/2):1-8, 1982.

RESUMO: Foi estudada a aplicação da contraímuno-elektroforese em fitas de acetato de celulose no diagnóstico das meningites por *S. pneumoniae* e na sorotipagem dos pneumococos responsáveis por esta infecção em nosso meio. Este método foi aplicado em 547 amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes internados no Hospital Emílio Ribas, São Paulo, Brasil. Antígenos polissacarídicos capsulares deste microorganismo foram detectados em 85,18% das 216 amostras positivas na cultura, quando se utilizou soro polivalente contra os 83 tipos de pneumococo. Este índice se elevou a 90,74% quando foram utilizados, separadamente, 9 diferentes pools de soros, contendo cada um anticorpos específicos para 7 até 11 tipos de pneumococo. Sete das 296 amostras de líquido cefalorraquidiano, negativas na cultura e na bacterioscopia, foram positivas na contraímuno-elektroforese, e 28 das 35 amostras de líquido cefalorraquidiano, negativas na cultura e positivas na bacterioscopia, foram também positivas na contraímuno-elektroforese. Foi verificada acentuada prevalência de pneumococos dos grupos 6 e 18 em crianças de até 9 anos. Nas faixas etárias mais altas, foram frequentes os tipos 1, 2, 3 e 4, e os grupos 7 e 12. O método clássico (Neufeld) de sorotipagem aplicado em algumas cepas isoladas de líquido cefalorraquidiano apresentou concordância absoluta com a contraímuno-elektroforese, quanto aos tipos de pneumococo identificados em cada caso. Na tipagem do pneumococo foi utilizado o sistema de nomenclatura dinamarquês.

DESCRIPTORIOS: meningite pneumocócica, imunodiagnóstico; *Streptococcus pneumoniae* no líquido cefalorraquidiano, identificação dos sorotipos; contraímuno-elektroforese.

INTRODUÇÃO

A contraímuno-elektroforese (CIE) é muito útil no diagnóstico das meningites sépticas pois permite identificar quantidades mínimas de antígenos bacterianos no líquido cefalorraquidiano (LCR), principalmente os de natureza polissacarídica.

As bactérias capsuladas, como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *S. pneumoniae*, responsáveis por mais de 90% dos casos de infecções bacterianas das meningites, podem ser facilmente identificadas por esta técnica, através dos polissacarídeos capsulares, presentes no LCR^{7, 9, 13}.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

A possibilidade de se prevenirem as infecções pneumocócicas por meio de vacinas que contêm polissacarídeos purificados e de alto peso molecular já foi demonstrada^{3,4}. De todas essas verificações, ficou bem evidenciado que, para essas vacinas serem eficazes, devem conter polissacarídeos idênticos àqueles presentes na cápsula da bactéria responsável pela infecção, sendo portanto necessário identificar não só o agente etiológico como também o tipo sorológico a que pertence.

Com esse objetivo, vêm sendo elaborados trabalhos visando identificar, em vários países, quais os tipos prevalentes de *S. pneumoniae* nas infecções humanas^{6, 8, 10, 12, 14}.

O método clássico para identificação dos pneumococos tem sido o de Neufeld (reação *quellung*), no qual o entumescimento da cápsula da bactéria, quando é tratada por soros específicos, permite identificar qual o tipo sorológico da mesma. Porém, a sorotipagem pela contraímunoeletroforese em gel de agarose já foi utilizada por alguns autores, como alternativa para este método^{8, 14}.

No presente trabalho foram verificados os tipos prevalentes de *S. pneumoniae* nas infecções meningéas, através da contraímunoeletroforese em fitas de acetato de celulose.

MATERIAL E MÉTODOS

Em 1977 e 1978 foram estudadas 547 amostras de LCR de pacientes internados no Hospital Emílio Ribas, das quais, em 251, o pneumococo foi identificado pelos métodos clássicos de cultura, ou sua presença revelada pela bacterioscopia pelo método de Gram; nas outras 296 amostras de LCR a etiologia da infecção não foi identificada pelos métodos bacteriológicos clássicos.

Dentre as cepas de pneumococo isoladas, algumas foram tipadas no Serviço do Dr. Robert Austrian, do Laboratório de Referência de Pneumococos da Universidade de Pennsylvania, Estados Unidos.

O sistema de nomenclatura utilizado na tipagem do pneumococo foi o dinamarquês.

Soros utilizados (do Statens Serum Institute, Copenhague, Dinamarca)

— *Omniserum*, soro polivalente que contém anticorpos para os 83 tipos de *S. pneumoniae*.

— Nove *pools* (mistura de vários soros) simbolizados alfabeticamente de A até I, cada qual contendo de 7 a 11 soros monoespecíficos. Estes *pools*, juntos, continham o total de anticorpos para os 83 tipos de *S. pneumoniae*.

— Soros específicos para cada um dos tipos ou grupos de *S. pneumoniae*.

Os exames bacteriológicos constaram de bacterioscopia pelo método de Gram, modificado por Hucker, e de cultura em meio de ágar-sangue, base Mueller-Hinton, e caldo Mueller-Hinton hipertônico. Após crescimento bacteriano, se confirmada a presença de diplococos Gram-positivos, eram feitas provas diferenciais com discos de optoquina e era verificada a fermentação da inulina.

Contraímunoeletroforese

Foi realizada em fitas de acetato de celulose¹³, utilizando-se tampão barbital acetato, pH 8,6, força iônica = 0,05, durante 10 minutos, voltagem fixa 200 V.

RESULTADOS

Na tabela 1 verificamos que das 216 amostras de LCR, em que a bactéria foi identificada pelos métodos bacteriológicos usuais, em 85,18% foi também possível detectar a presença de antígenos capsulares de *S. pneumoniae*, quando o soro usado na corrida eletroforética foi o *omniserum*. Dos 296 casos, com exame bacteriológico negativo, em 7 a CIE revelou a presença desses antígenos.

A tabela 2 representa o número de amostras reagentes na CIE, com os *pools* de soros A — I, comparado com o número de amostras positivas, quando se utilizou o *omniserum*. Esta comparação foi possível em apenas 191 casos, uma vez que não tínhamos LCR suficiente para que a prova fosse realizada em todos os casos incluídos na tabela 1. A utilização desses *pools* de soros possibilitou a detecção de antígenos capsulares de *S. pneumoniae* em 12 amostras de LCR que não haviam apresentado reação com o *omniserum*. Desta forma, o índice de positividade pela prova de CIE elevou-se de 85,18 para 90,74%.

Como se observa na tabela 3, houve uma variação na distribuição dos tipos prevalentes de *S. pneumoniae*, quando se compararam dois períodos de 11 meses separadamente.

Os resultados obtidos na sorotipagem de 52 amostras de LCR pelo método de Neufeld no Laboratório de Referência de Pneumococos da U.P., E.U.A., foram comparados com os resultados obtidos com a CIE. Ambos os métodos foram concordantes quanto ao tipo de pneumococo identificado em cada caso, porém, em 4 amostras reativas na CIE os germes isolados não apresentaram reação *quellung*, e foram identificados como *Streptococcus* sp. α -hemolíticos. Destas amostras, uma foi reativa na CIE com soro específico para pneumococo do grupo 6 e três, reativas com soro específico para pneumococo do tipo 8.

Afastados todos os casos nos quais não foi possível identificar a idade, verifica-se, conforme a tabela 4, acentuada prevalência dos tipos pertencentes aos grupos 6 e 18, em crianças com idade até 4 e 9 anos, respectivamente. Na faixa etária até um ano, além

dos tipos acima mencionados, também foram freqüentes os pneumococos do tipo 5 e do grupo 9. Já nas faixas etárias mais altas, 20 anos ou mais, foram mais freqüentes os pneumococos dos tipos 1, 2, 3 e 4, e dos grupos 7 e 12.

TABELA 1

Comparação entre os resultados dos exames bacteriológicos e contraímunoeletroforese, quando o soro utilizado na corrida eletroforética foi o omniserum

Exame bacteriológico	Contraímunoeletroforese		Total de amostras analisadas
	Amostras positivas	Amostras negativas	
Bacterioscopia (DGP*) Cultura (P*)			
Bacterioscopia positiva Cultura positiva	184	32	216
Bacterioscopia positiva Cultura negativa	28	7	35
Bacterioscopia negativa Cultura negativa	7	289	296
Total	219	328	547

* (DGP) = diplococos Gram-positivos.

* (P) = pneumococos.

TABELA 2

Comparação entre os resultados obtidos pela contraímunoeletroforese das amostras de líquido cefalorraquidiano com omniserum e pools A — I

Omniserum	Pools A — I		
	Amostras positivas	Amostras negativas	Total
Amostras positivas	163	0	163
Amostras negativas	12	16	28 (*)
Total	175	16	191

(*) Presença de *S. pneumoniae* verificada por cultura do líquido cefalorraquidiano.

PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A.E. — Detecção de antígenos polissacarídicos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em líquido cefalorraquidiano pela contraímunoeletroforese. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):1-8, 1982.

TABELA 3

Distribuição dos tipos e grupos de S. pneumoniae detectados pela contraímunoeletroforese em líquido cefalorraquidiano, durante um período de 22 meses (1977-1978)

Tipos e grupos (Sistema dinamarquês)	N.º Amostras		Total
	Janeiro-novembro 1977	Dezembro-outubro 1977 — 1978	
1	8	7	15
2	6	1	7
3	5	2	7
4	1	6	7
5	6	4	10
6	17	7	24
7	2	2	4
8	3	4	7
9	4	1	5
10	0	2	2
11	1	1	2
12	5	3	8
13	0	1	1
14	3	1	4
15	2	3	5
16	0	1	1
17	0	1	1
18	9	7	16
19	2	3	5
20	0	2	2
21	0	2	2
22	1	0	1
23	1	8	9
25	1	0	1
29	1	1	2
33	0	1	1
45	0	1	1
48	1	0	1
NT-1(*)	5	1	6
NT-2	5	1	6
NT-3	5	3	8
NT-4	1	2	3
NT-5	0	1	1

(*) NT = Pneumococos não sorotipados; identificados apenas pelos pools de soros: 1) pool B; 2) pool D; 3) pool E; 4) pool H; 5) pool I.

TABELA 4

Distribuição dos tipos e grupos de *S. pneumoniae* de acordo com a faixa etária dos pacientes com meningite

Faixa etária	Tipos e grupos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Sistema dinamarquês)																												Total
	1	2	3	4	5	6*	7*	8	9*	10*	11*	12*	14	15*	16	17*	18*	19*	20	21	22*	23*	25	28*	29	33*	45	48	
0 — 12 meses	2	2	1	1	4	8	-	2	3	-	-	2	1	1	-	-	3	1	-	1	-	2	-	-	2	1	-	-	37
1 — 4 anos	-	-	-	-	-	7	-	1	-	1	-	1	2	2	-	1	5	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	23
5 — 9 anos	1	-	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	3	1	1	-	-	1	-	2	-	-	-	-	13
10 — 14 anos	3	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
15 — 19 anos	2	-	-	2	1	1	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
20 — 49 anos	4	3	5	3	2	-	3	1	-	-	-	3	-	1	1	-	2	-	-	1	1	1	1	1	-	-	1	1	34
50 ou mais anos	-	2	1	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
Total	12	7	7	7	8	18	3	7	4	2	2	7	4	5	1	1	14	5	2	2	1	7	1	2	2	1	1	1	134

(*) Grupos aos quais pertencem 2 ou mais tipos de pneumococos.

Observação: Os casos de idade ignorada foram excluídos desta tabela.

PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLERS, C.E.A. & TAUNAY, A.E. — Detecção de antígenos polissacarídicos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em líquido cefalorraquidiano pela contraímunoeletroforese. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):1-8, 1982.

DISCUSSÃO

Estes resultados mostram a possibilidade de se identificar o sorotipo de um pneumococo diretamente no LCR através da CIE. A maior ou menor sensibilidade da reação fica na dependência da disponibilidade de soros bastante potentes capazes de identificar quantidades ínfimas de antígeno no LCR. Este fato ficou demonstrado na tabela 2, onde se verificou maior sensibilidade, da CIE, com *pools* de soros A — I, do que com o *omniserum*.

Uma vez identificada a prevalência dos sorotipos de pneumococo numa determinada região, teremos possibilidade de preparar *pools* de soros de maior potência, que poderão ser usados com vantagem em substituição aos que são preparados para regiões onde a distribuição dos tipos de pneumococo difere da nossa.

Os polissacarídeos capsulares dos pneumococos tipos 7F e 14 são neutros e, como não apresentam migração anódica adequada nas condições próprias da CIE, não são detectáveis a menos que se usem sistemas tampões especiais¹. No entanto, no presente trabalho foram detectados 4 casos de meningite por pneumococos do grupo 7, utilizando-se o tampão convencional (barbital acetato, pH 8,6). Destes casos, 2 foram submetidos ao teste de Neufeld, que confirmou o grupo de pneumococo e revelou positividade de ambos, com soro específico para o tipo 7F. Já o tipo 14 foi detectado pela CIE somente depois de se ter deixado a fita de acetato de celulose em repouso, 18 horas após a corrida eletroforética.

Foi verificado que, em 4 amostras de LCR, reativas na CIE, o germe isolado foi identificado como *Streptococcus* α -hemolítico no Laboratório de Referência da U.P. — E.U.A. A ocorrência deste fato se explica pela existência de reações cruzadas entre polissacarídeos capsulares de pneumococos e certas cepas de estreptococos α -hemolíticos e não hemolíticos, fato este já descrito por vários investigadores. Como exemplo, podemos citar as reações cruzadas entre antígenos capsulares de estreptococos do grupo F de Lancefield e uma variedade de tipos de pneumococo¹¹, entre eles o tipo 7.

São conhecidas também as reações cruzadas entre estreptococos não capsulados e alguns tipos patogênicos de pneumococos², tais como os tipos 1, 2, 3, 6, 8 e 14. A presença de anticorpos que dão reações cruzadas entre estreptococos e pneumococos, em determinados so-

ros, origina uma classificação errônea de ambos. Esta fonte de erros pode ser evitada em grande parte pelo uso da reação *quellung* a qual, quando positiva, demonstra a localização capsular do carboidrato reativo.

Pneumococos capsulados mutantes, que produzem uma cápsula de polissacarídeo solúvel relacionado imunologicamente ao polissacarídeo C da parede celular, têm sido isolados de variantes não capsuladas desses organismos⁵. Anticorpos de alto título para antígenos de parede celular de pneumococo, produzidos a partir desses mutantes, foram testados por AUSTRIAN² com várias cepas de estreptococos que dão reações cruzadas com pneumococos. Os resultados obtidos nesses experimentos sugerem a possibilidade de haver reações cruzadas entre os polissacarídeos de parede celular de estreptococos e o polissacarídeo somático de pneumococos.

Segundo AUSTRIAN², estudos anteriormente feitos com estreptococos capsulados que apresentavam reações cruzadas com uma variedade de tipos de pneumococo, mostraram que os primeiros diferem dos últimos por uma série de características. Nenhuma das cepas destes estreptococos foram lisadas pelo desoxicolato, e cerca de 1% se mostrou sensível à optoquina. Das cepas que fermentaram a inulina, a maior parte foi encontrada entre os estreptococos que se apresentaram morfologicamente em cadeias de comprimento moderado e que davam reação cruzada com pneumococo tipo 59.

A despeito da identificação de estreptococos α — hemolíticos nas amostras de LCR citadas acima, cumpre ressaltar o fato de que em nosso laboratório tais amostras apresentaram diplococos Gram-positivos que em cultura, mostraram características de *S. pneumoniae* (sensibilidade à optoquina e fermentação da inulina).

Sob certos aspectos, a utilização da CIE na sorotipagem de *S. pneumoniae* oferece alguns benefícios, como: permite examinar grande número de amostras em pouco tempo; pesquisa antígenos solúveis os quais podem ser detectados em amostras guardadas há vários meses em refrigeração comum, e não exige experiência por parte do laboratorista, pois a leitura dos resultados é de fácil interpretação.

Agradecimentos

A Dra. Ilka Lee, do Serviço de Bacteriologia do IAL, pela realização dos exames bacteriológicos.

PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A.E. — Detection of polysaccharidic capsular antigens and typing of *Streptococcus pneumoniae* isolated from spinal fluid by counterimmunoelctrophoresis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):1-8, 1982.

ABSTRACT: Counterimmunoelctrophoresis in cellulose-acetate strips were employed for the serological diagnosis of meningitis cases caused by *Streptococcus pneumoniae* as well as in the serotyping of pneumococcus strains isolated from meningitis cases admitted to Emilio Ribas Hospital, São Paulo, S.P., Brazil. Polysaccharidic antigens of pneumococci were detected in 85.18% of the 216 spinal-fluid specimens from which pneumococci were isolated when polyvalent serum against the 83 types was employed. This frequency increased to 90.74% when 9 different pools of sera containing antibodies specific for 7 to 11 types were employed. Of 296 spinal-fluid specimens which were negative in culture and bacterioscopic tests, 7 specimens were positive in the counterimmunoelctrophoresis. Of the 35 specimens which were negative in culture attempts but positive in the bacterioscopic examination, 28 were positive in the counterimmunoelctrophoresis. A clear prevalence of group 6 or 18 pneumococci was found in spinal fluids from children up to 9 year-old. In older individuals, types 1, 2, 3 or 4 and groups 7 or 12 were observed. The classic Neufeld test yielded exactly the same results as the counterimmunoelctrophoresis. The Danish nomenclature was employed.

DESCRIPTORS: meningitis, pneumococcal, immunodiagnosis; *Streptococcus pneumoniae*, in the spinal fluid, serotype identification; counter-current immunoelctrophoresis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANHALT, J.P. & PAULINE, K.W.Y. — Counterimmunoelctrophoresis of pneumococcal antigens: improved sensitivity for the detection of types VII and XIV. *J. clin. Microbiol.*, 2:510-5, 1975.
2. AUSTRIAN, R. — Streptococci and streptococcal diseases. Recognition, understanding and management. New York, Academic Press, 1972. p. 355-70.
3. AUSTRIAN, R. — Pneumococcal vaccines. *J. Amer. med. Ass.*, 231:345-6, 1975.
4. AUSTRIAN, R. — Prevention of pneumococcal infection by immunization with capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: current status of polyvalent vaccines. *J. infect. Dis.* (Suppl.), 136: S-38-S42, 1977.
5. BORNSTEIN, D.L.; SCHIFFMAN, G.; BERNHEIMER, H.P. & AUSTRIAN, R. — Capsulation of pneumococcus with soluble C-like (C_2) polysaccharide. I. Biological and genetic properties of C_2 pneumococcal strains. *J. exp. Med.*, 128: 1385-400, 1968.
6. BROOME, C.V.; FACKLAM, R.R.; ALLEN, J.R. & FRASER, D.W. — Epidemiology of pneumococcal serotypes in the United States, 1978-1979. *J. infect. Dis.*, 141: 119-23, 1980.
7. COONROD, J.D. & RYTEL, M.W. — Determination of aetiology of bacterial meningitis by counterimmunoelctrophoresis. *Lancet*, 1(7759):1154-7, 1972.
8. COONROD, J.D. & RYTEL, M.W. — Detection of type-specific pneumococcal antigens by counterimmunoelctrophoresis. Etiology of pneumococcal pneumonia. *J. Lab. clin. Med.*, 81:778-86, 1973.
9. EARL, A.E.; MUEHL, P.M. & PECKIN-PAUGH, R.O. — Diagnosis of bacterial meningitis by counterimmunoelctrophoresis. *J. Lab. clin. Med.*, 80:449-54, 1972.
10. FINLAND, M. & BARNES, M.W. — Changes in occurrence of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* at Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974. *J. clin. Microbiol.*, 5:154-66, 1977.
11. HEIDELBERGER, M.; WILLERS, J.M.N. & MICHEL, M.F. — Immunochemical relationships of certain streptococcal group and type polysaccharides to pneumococcal capsular antigens. *J. Immunol.*, 102: 1119-35, 1969.
12. LUND, E.; PULVERER, G. & JELSJASZEWIEZ, J. — Serological types of *Diplococcus pneumoniae* strains isolated in Germany. *Med. Microbiol. Immunol.*, 159: 171-8, 1974.

PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A.E. — Detecção de antígenos polissacarídicos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em líquido cefalorraquidiano pela contraímunoelctroforese. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):1-8, 1982.

13. PALHARES, M.; GELLI, D.S.; ALMEIDA, M.C.R.; MELLIS, C.E.A.; TAKEDA, A.K. & TAUNAY, A.E. — Pesquisa de polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* do grupo C no líquido cefalorraquidiano por imunoelctroforese cruzada em acetato de celulose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33:85-89, 1978.
14. TUGWELL, P. & GREENWOOD, B.M. — Pneumococcal antigen in lobar pneumonia. *J. clin. Pathol.*, 28:118-23, 1975.

Recebido para publicação em 12 de maio de 1981.