

VALOR DA BACTERIOSCOPIA, CULTURA E IMUNOELETROFORESE CRUZADA NO DIAGNÓSTICO DAS MENINGITES BACTERIANAS *

Carmo Elias Andrade MELLES **
Ilka Maria LANDGRAF **
Maria Lúcia FARACO **
Nereide Borges BOSCARDIN **

RIAL6/660

MELLES, C.E.A; LANDGRAF, I.M.; FARACO, M.L. & BOSCARDIN, N.B. --
Valor da bacterioscopia, cultura e imunoelctroforese cruzada no diagnóstico das meningites bacterianas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1):61-67, 1989.

RESUMO: Em período pós-epidêmico de meningite bacteriana foi planejado comparar a possibilidade do exame bacterioscópico, cultura e pesquisa de antígenos polissacarídeos através da imunoelctroforese cruzada (IEC) no diagnóstico dos três agentes etiológicos que aparecem com maior frequência nestas infecções, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Nas 326 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) em que foram identificadas estas bactérias, o exame bacterioscópico foi positivo em 273 (83,74%), a IEC em 273 (83,74%) e a cultura em 207 (63,50%). Para o total de amostras estudadas tivemos igual número de casos diagnosticados pela bacterioscopia e IEC ($p < 0,05$); entretanto, quando comparamos a positividade dos métodos laboratoriais associados entre si, a positividade da bacterioscopia para os três agentes citados (95,33%) supera a da IEC (91,05%) e a da cultura (77,04%) ($p \leq 0,05$). A IEC é um importante método diagnóstico, principalmente quando aplicado em LCR que por qualquer razão é impróprio à bacterioscopia e cultivo de bactérias. Nenhum dos métodos citados deverá ser utilizado em detrimento do outro; a associação dos métodos além de melhorar as possibilidades diagnósticas evitando erros de interpretação, estabelece controle de qualidade no diagnóstico laboratorial.

DESCRIPTORIOS: meningite bacteriana, diagnóstico laboratorial.

INTRODUÇÃO

As meningites bacterianas, apesar do desenvolvimento de novas drogas antibacterianas, continuam grassando entre nós, com alta incidência. O cuidadoso exame laboratorial do líquido cefalorraquidiano (LCR) é o suporte para o diagnóstico e tratamento adequado do paciente.

Na rotina laboratorial, são utilizados para o diagnóstico das meningites o exame bacterioscópico, a cultura e a pesquisa de antígenos polissacarídeos no LCR através da imunoelctroforese cruzada (IEC).

O exame bacterioscópico do LCR é da maior valia pela grande rapidez com que se pode demonstrar o agente bacteriano, a observação de qualquer morfologia bacteriana neste exame é importante para o clínico, pois será guia na escolha inicial do antibiótico para o tratamento^{1,3,7}. O valor diagnóstico do exame bacterioscópico está na dependência de sua correta interpretação, pois mesmo um técnico experiente pode cometer erros de leitura^{17,43}, e também, no número de bactérias contidas no LCR que geralmente, só é positivo quando a concentração for de 10^5 bactérias/mililitro de uma amostra de LCR não centrifugada^{27,38}.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Podem acontecer enganos na interpretação dos resultados da bacterioscopia, pois os microrganismos podem sofrer alterações físico-químicas, provocando desvios na coloração de Gram^{2,4,5}. Outra fonte de erro no diagnóstico pela bacterioscopia é o resultado falso-positivo dado por bactérias não viáveis oriundas de tubos de ensaio contaminados^{3,7,44}, por falhas na limpeza de lâminas de microscopia¹², e por bactérias agregadas à células epidérmicas quando o paciente é punccionado^{2,5}. A frequência com que ocorrem falhas no exame bacterioscópico pode ser da ordem de 10-15%, quando comparado aos resultados obtidos pelo cultivo de bactérias^{3,4,7,25}.

Para o cultivo das bactérias são necessárias várias preocupações que deverão ser tomadas e que possibilitam o crescimento dos microrganismos, sendo indispensáveis os cuidados no transporte e conservação do LCR, bem como, a escolha dos meios de cultura utilizados no diagnóstico bacteriológico. Geralmente, os microrganismos causadores de meningites bacterianas são bastante sensíveis até a pequenas variações de temperatura e teor de umidade^{16,29,45}.

São múltiplos os fatores que podem influir na viabilidade das bactérias, principalmente do meningococo, como o volume de LCR semeado⁴⁰, sua composição², condições de conservação e transporte^{10,34,35}, e ainda a ação da antibioticoterapia prévia à punção^{30,31,33,36}. Devido a estes fatores são recomendados exames imunológicos como complementares no diagnóstico das meningites bacterianas, entre os quais utiliza-se, principalmente, a imunoelectroforese cruzada (IEC) na pesquisa de antígenos⁵ bacterianos eventualmente presentes no LCR^{13,15,42}.

A IEC pode ser empregada na pesquisa de antígenos polissacarídeos de *N. meningitidis*^{9,10,20}, de *S. pneumoniae* e de *H. influenzae*^{11,23,24}. Esta metodologia foi padronizada entre nós e demonstrou grande sensibilidade e especificidade^{6,38,39,41}.

Algumas restrições são feitas ao uso desta prova imunológica relacionadas ao aparecimento eventual de resultados falsos, devidos a reações cruzadas entre gêneros e espécies^{14,19,29,32}. Saliênta-se que o valor da imunoelectroforese cruzada no diagnóstico das meningites bacterianas depende inteiramente da qualidade dos reagentes e do anti-soro empregados na reação⁶.

Em publicação anterior MELLES et alii³³, fazendo estudo de métodos comparativos de diagnóstico das meningites bacterianas, dentro do período epidêmico causado pela *N. meningitidis* e obedecendo a todos os parâmetros já mencionados nos cuidados com o LCR, empregaram, com sucesso, além dos métodos laboratoriais citados

acima, a pesquisa de anticorpo pela hemaglutinação passiva. O presente trabalho visa analisar a metodologia utilizada para o diagnóstico das meningites bacterianas através dos resultados obtidos na rotina diagnóstica de nosso laboratório em período pós epidêmico quando houve maior variedade de agentes etiológicos diagnosticados quando comparado com o período epidêmico.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Em período de aproximadamente 12 meses, de 1981-1982, foram analisadas 641 amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com suspeita de meningite bacteriana. Os LCR foram provenientes do Hospital Emílio Ribas, São Paulo, e os exames laboratoriais foram processados nas Seções de Bacteriologia e Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

Métodos

A metodologia seguida para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas foi a recomendada pelo Centro de Referência Nacional para Meningites, Instituto Adolfo Lutz - Ministério da Saúde⁵.

Os anti-soros aglutinantes e precipitantes para *N. meningitidis* e *H. influenzae* foram preparados no Instituto Adolfo Lutz. Os de *S. pneumoniae* foram provenientes do "Stats Serum Institut", Copenhagem, Dinamarca.

RESULTADOS

Das 641 amostras de LCR, examinadas no período indicado, 326 foram positivas sendo que 145 o foram para *N. meningitidis*, 98 para *S. pneumoniae* e 83 para *H. influenzae*, através dos exames bacterioscópico, cultura e IEC. Estes resultados estão expostos na tabela nº I, na qual verificamos que, para estes agentes citados, a IEC foi o exame laboratorial que, quando usado separadamente, obteve o maior índice de positividade, ou seja, 11,96% do total das amostras. Em seguida vem a bacterioscopia com 7,97% e a cultura com 1,23%. Quando a IEC foi utilizada em combinação ou associada à bacterioscopia e à bacterioscopia mais cultura, a positividade passou a ser 16,56% para a primeira combinação e 52,15% para a segunda.

Nos resultados obtidos para os agentes isoladamente, verificamos que, no diagnóstico do *H. influenzae*, a IEC corresponde à segunda maior frequência de positividade, o mesmo acontecendo para o meningococo quando esta prova foi associada à bacterioscopia.

Relacionando o número de vezes e o percentual com que cada método laboratorial apresentou positividade nas 326 amostras de LCR, verificamos, na tabela nº 2, que a cultura foi o exame de mais baixa positividade para o conjunto de agentes etiológicos diagnosticados (63,50%). Quando consideramos a bacterioscopia e IEC para este mesmo conjunto de bactérias, verificamos o mesmo percentual de positividade (83,74%) com $p < 0,05$ independente da presença de fatores impeditores no LCR. Ainda, nesta tabela, constatamos, nos agentes bacterianos isoladamente, discreta superioridade da bacterioscopia sobre a IEC, quando a bactéria identificada foi o meningococo (84,14% - 82,75%). O inverso, com considerável superioridade (71,08% - 95,18%), aconteceu para o *Haemophilus* porque o seu diagnóstico presuntivo de gênero não poderia ser dado simplesmente pela bacterioscopia; os dados considerados foram os da soma das amostras em que a bacterioscopia foi positiva juntamente com a cultura e ou IEC. Para o pneumococo, a tabela mostra que foi evidente a superioridade da bacterioscopia na visualização da sua morfologia característica (93,87% - 75,51%). O valor da cultura foi o mesmo que da IEC na sua identificação (75,51%).

Tomando somente aquelas amostras de LCR em que a etiologia bacteriana foi esclarecida quando houve associação dos métodos laboratoriais,

ou seja, em 257 (78,83%) das 326 amostras totais positivas, verificamos que, independentemente da presença de elementos impeditores no LCR, o agente etiológico foi identificado pela combinação parcial ou total de bacterioscopia, cultura e IEC. Considerando separadamente o diagnóstico de cada agente etiológico verificamos que, através dessa associação, o meningococo foi identificado em 106 (73,10%) das 145 amostras positivas para meningococo, o pneumococo em 87 (88,77%) das 98 amostras positivas para pneumococo e o *H. influenzae* em 64 (77,10%) das 83 amostras positivas para esta bactéria (tabela 3).

Comparando isoladamente cada método laboratorial participante dessa associação, pudemos verificar que a bacterioscopia foi positiva em 95,33% das oportunidades de exames realizados, a IEC em 91,05% e a cultura em 77,04% com $p < 0,05$.

Como pode ser verificado ainda, na tabela 3, a concordância dos resultados positivos para a bacterioscopia quando em associação, ou seja, quando confirmada pela IEC ou cultura foi de 95,28% nas amostras de LCR positivas para meningococo; de 100,00% para o pneumococo, e de 92,18% para o *H. influenzae*. Em relação à IEC, a concordância de resultados foi de 98,11% para o meningococo, 79,31% para o pneumococo e para o *H. influenzae* foi de 95,31%.

TABELA 1

Identificação da *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* pela bacterioscopia, imunoelectroforese cruzada e cultura, isoladamente e nas várias combinações

Agente etiológico no LCR Exame Laboratorial	<i>N. meningitidis</i>		<i>S. pneumoniae</i>		<i>H. influenzae</i>		Total	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Bacterioscopia	21	(14,5)	5	(5,1)	—	—	26	(7,97)
Imunoelectroforese cruzada	16	(11,0)	5	(5,1)	18	(21,7)	39	(11,96)
Cultura	2	(1,4)	1	(1,0)	1	(1,2)	4	(1,23)
Bacterioscopia + I.E.C.	34	(23,4)	14	(14,3)	6	(7,2)	54	(16,56)
Bacterioscopia + Cultura	2	(1,4)	18	(18,4)	3	(3,6)	23	(7,06)
Cultura + I.E.C.	5	(3,4)	—	—	5	(6,0)	10	(3,07)
Bacterioscopia + cultura + I.E.C.	65	(44,9)	55	(56,1)	50	(60,3)	170	(52,15)
Total de casos	145	(100,00)	98	(100,00)	83	(100,00)	326	(100,00)

I.E.C. = Imunoelectroforese cruzada.

TABELA 2

Positividade dos três métodos laboratoriais utilizados no diagnóstico da *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*

Exame laboratorial \ Agente etiológico no LCR	<i>N. meningitidis</i> (145 amostras)		<i>S. pneumoniae</i> (98 amostras)		<i>H. influenzae</i> (83 amostras)		Total (326 amostras)	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Bacterioscopia	122	(84,14)	92	(93,87)	59	(71,08)	273	(83,74)
Imunoelectroforese cruzada	120	(82,75)	74	(75,51)	79	(95,18)	273	(83,74)
Cultura	74	(51,03)	74	(75,51)	59	(71,08)	207	(63,50)

TABELA 3

Número e percentual de vezes em que os três métodos laboratoriais foram positivos, quando em associação parcial ou total no diagnóstico dos três agentes etiológicos estudados

Exame laboratorial \ Agente etiológico no LCR	<i>N. meningitidis</i> (106 amostras 73,10%)		<i>S. pneumoniae</i> (87 amostras 88,77%)		<i>H. influenzae</i> (64 amostras 77,10%)		Total (257 amostras 78,83%)	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Bacterioscopia	101	(95,28)	87	(100,00)	59	(92,18)	245	(95,33)
Imunoelectroforese cruzada	104	(98,11)	69	(79,31)	61	(95,31)	234	(91,05)
Cultura	67	(63,20)	73	(83,90)	58	(90,65)	198	(77,04)

DISCUSSÃO

No período estudado as meningites bacterianas diagnosticadas por nosso laboratório foram causadas por número razoável de diferentes bactérias, tendo na *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* os agentes etiológicos predominantes, seguidos por enterobactérias, cocos Gram-positivos, excetuando o pneumococo, *Listeria monocy-*

togenes e microbactérias. Foram, separados para este estudo os três primeiros agentes citados por serem considerados como de difícil diagnóstico laboratorial devido a suas exigências nutricionais, de manutenção e sensibilidade a condições diversas.

Os resultados obtidos através da bacterioscopia (tabela 1) evidenciam pouca segurança no

diagnóstico presuntivo do *H. influenzae*, razão porque a IEC deve ser o método de escolha no diagnóstico das meningites causadas por esse agente etiológico. Ainda, que o aumento do percentual de positividade, obtido pela associação dos métodos bacterioscópico-IEC e, principalmente, bacterioscopia-cultura e IEC, permite inferir que esta associação de métodos deverá ser utilizada para o diagnóstico laboratorial das meningites suspeitas clínica e epidemiologicamente de serem causadas por estes três agentes bacterianos escolhidos.

Deve ser comentado, segundo os resultados obtidos (tabela 2) que, no total de amostras estudadas, ou seja, naquelas em que foram identificados um dos três agentes etiológicos, o percentual de positividade para a bacterioscopia e IEC, quando empregados isoladamente, foi o mesmo, levando à assertiva de que não há distinção na escolha de um determinado método laboratorial a ser utilizado no diagnóstico destas meningites causadas por estes três agentes bacterianos.

Quando consideramos o número e o percentual de vezes em que os exames laboratoriais foram positivos (tabela 3) e quando utilizamos somente a combinação dos métodos laboratoriais, podemos inferir dos resultados que a bacterioscopia foi o método mais sensível, seguido da IEC e finalmente a cultura.

Ficou evidente, nas amostras de LCR em que foram identificados qualquer destes três agentes bacterianos, que estes resultados foram obtidos em 78,84% das vezes por combinação da bacterioscopia, IEC e cultura e os restantes resultados foram obtidos por cada um dos métodos quando realizados isoladamente. Dados semelhantes ou próximos foram obtidos por MELLES et alii³³, quando trabalharam com amostragem de LCR obtida dentro do período epidêmico da doença meningocócica quando, obviamente, o agente etiológico predominante foi o meningococo.

Quanto ao resultado do diagnóstico do *H. influenzae*, em que a positividade da IEC foi alta, praticamente o dobro em relação a *N. meningitidis*, demonstrando a importância do uso desse método imunológico, deve ser lembrado insistentemente que a bacterioscopia isoladamente não se prestou ao diagnóstico de gênero no caso deste agente, e a confirmação bacterioscópica desta bactéria visualizada no esfregaço só foi válida quando a cultura ou a IEC resultaram positivas. Não há dúvida, segundo nossa experiência, de que nos casos de meningites purulentas com bacterioscopia exaustivamente negativa e diagnóstico pendente da cultura e, ainda, para LCR conservados e transportados inadequadamente, a IEC é o método de escolha, não só pela facilidade de implantação da

técnica como pela sensibilidade e rapidez no seu processamento.

Os resultados apresentados decorrentes da metodologia usada são tecnicamente perfeitos dentro dos conhecimentos e possibilidades técnico-científicas atuais, e qualquer eventual falha seria por causas fora de nosso controle, como por exemplo, na visualização durante o exame bacterioscópico de alguns bacilos Gram-negativos que não tiveram confirmação posterior com crescimento da bactéria na cultura ou seus antígenos não foram detectados na IEC, resultando que não poderiam ser enquadrados dentro do gênero, pois tanto poderia ser uma enterobactéria como um hemófilo.

Como foi extensamente relatado na introdução deste trabalho, algumas falhas que poderiam ocorrer nos exames por conta de deficiências na limpeza, manutenção de lâminas, tubos de ensaio e outros, durante a colheita e transporte do material, estão completamente afastadas porque todos os detalhes foram aventados durante o planejamento do trabalho, incluindo o uso dos corantes filtrados no momento do uso e parâmetros adotados na leitura das lâminas; se persistisse qualquer dúvida, a orientação foi para que "seria preferível o resultado negativo a um falso positivo".

Em relação aos anti-soros específicos usados para pesquisa de antígenos de polissacarídeos, através da IEC, estes foram por nós produzidos e testados sobre sua validade com controle de qualidade usando cepas e antígenos padrões. O anti-soro para *S. pneumoniae* foi fornecido por laboratório estrangeiro de alto padrão técnico-científico.

Finalmente, tendo em vista a importância e o desempenho de cada exame e as dificuldades encontradas e inerentes a cada método laboratorial, não temos dúvidas em estabelecer como parâmetro os três métodos empregados, dois bacteriológicos e o imunológico, no diagnóstico das meningites bacterianas causadas, em especial, pelos três agentes etiológicos estudados. Esta afirmativa baseia-se no fato de que os três métodos citados se completam, como demonstrado pela concordância dos resultados por nós obtidos neste trabalho, com número apreciável de amostras de LCR procedentes de pacientes com meningite bacteriana.

Deve, ainda, ser assinalado que nossos resultados são referentes a estudo prospectivo das meningites purulentas ou bacterianas realizado em período pós-epidêmico, representando desta maneira período de normalidade epidemiológica quando relacionado ao período anormal epidêmico. Ademais, que a maioria dos trabalhos nacionais existentes na literatura especializada^{38,39,41}, sobre o emprego do método imunológico comparado ou não com os métodos bacterioscópicos, é informativa sobre determinada bactéria isoladamente.

RIALA6/660

MELLES, C.E.A.; LANDGRAF, I.M.; FARACO, M.L. & BOSCARDIN, N.B. – Bacterioscopy, culture and counterimmunoelectrophoresis (IEC) values in the diagnosis of bacterial meningitis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):61-67, 1989.

ABSTRACT: In a post-epidemic period of bacterial meningitis, a comparative study by means of bacterioscopic analysis, culture and counterimmunoelectrophoresis (C.I.E.) of cerebrospinal fluid (C.S.F.) the three most frequent bacterias were *Neisseria Meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. From 326 cases considered, the bacterioscopic analysis was positive in 273 of them (83.74%), C.I.E. in 273 (83.74%) and culture in 207 (63.50%). In the total of the samples, the number of cases identified by bacterioscopic observation and by C.I.E. was just the same ($p < 0,05$) but when the three methods were compared in association the positivity of the bacterioscopic analysis was higher (95.33%) than C.I.E. (95.05%) and than culture (77.04%) ($p < 0,05$), C.I.E. is the most important diagnostic tool, chiefly when the usefulness of the other tests in CSF is not reliable, because of some technical reasons. None of these methods should be employed alone; therefore, when they are employed all together they may lead to a best diagnosis, that means to avoid interpretation error, and the best quality control for the diagnostic tools.

DESCRIPTORS: meningitis, bacterial, laboratorial diagnosis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACAR, J.F.; DUVAL, J.; PEROL, Y. & VERGEZ, P. – Le diagnostic dans les maladies bactériennes. *Rev. Prat.*, 17:1151-63, 1967.
2. AGBAYANI, M.M.; BRAUN, J.; CHANG, C.T.; GLASS, L. & EVANS, H.E. – Effect of CSF on bacterial growth. *Arch. Neurol.*, 38(1):43-5, 1981.
3. AMAR, R.; TOLEBEM, G.; SICRE, M.G.; LEMELAND, J.F.; LEROY, J. & HUMBERT, G. – Les meningites purulentes en Haute Normandie à propos d'une statistique hospitalière de 106 cas. *Lyon. med.*, 228 (18):517-25, 1972.
4. BHUSHAN, V. & CHINTU, C. – Changing pattern of pyogenic meningitis in Lusaka. *East. afr. med. J.*, 56(11):548-56, 1979.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas da Saúde. Divisão Nacional de Laboratórios de Saúde Pública – Normas técnicas para o diagnóstico das meningites bacterianas. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1986. 49 p. (Série A: Normas e manuais técnicos, 32).
6. CARBONARE, S.B.; TAKEDA, A.K.; JORDÃO, F.B.M. & TAUNAY, A.E. – Especificidade imunológica dos polissacarídeos extraídos de diferentes grupos de *Neisseria meningitidis*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34:119-25, 1974.
7. CARPENTER, R.P. & PETERSDORF, R.G. – The clinical spectrum of bacterial meningitis. *Amer. J. Med.*, 33(2):262-75, 1962.
8. COLDING, H. & LUND, J. – Counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of bacterial meningitis. *J. clin. Microbiol.*, 5(4): 405-9, 1977.
9. COONROD, J.D. & RYTEL, M.W. – Determination of aetiology of bacterial meningitis by counterimmunoelectrophoresis. *Lancet*, 1 (7761):1154-57, 1972.
10. EDWARDS, E.A. – Immunologic investigation of meningococcal disease I Group-specific *Neisseria meningitidis antigens present in the serum of patients with fulminant meningococemia*. *J. Immunol.*, 106 (2): 314-7, 1971.
11. EDWARDS, E.A.; MUEHL, P.M. & PECKIN-PAUGH, R.O. – Diagnosis of bacterial meningitis by counterimmunoelectrophoresis. *J. Lab. clin. Med.*, 80(3): 449-54, 1972.
12. ERICSSON, C.D.; CARMICHAEL, M.; PICKERING, L.K.; MUSSET, R. & KOHL, S. – Erroneous diagnosis of meningitis due to false-positive Gram stains. *med. J.*, 71(12):1524-5, 1978.
13. EVANS-JONES, L.G. – Difficulties in diagnosing meningococcal meningitis. *Brit. med. J.*, 1(6167):892-3, 1979.
14. FINCH, C.A. & WILKINSON, H.W. – Practical considerations in using C.I.E. to identify the principal causative agents of bacterial meningitis. *J. clin. Microbiol.*, 10(4):519-24, 1979.
15. FOSSIECK, B.J.; CRAIG, R. & PATERSON, P.Y. – Counterimmunoelectrophoresis for rapid diagnosis of meningitis due to *Diplococcus pneumoniae*. *J. infect. Dis.*, 127(1):106-9, 1973.
16. FRANTZ, I.D. – Growth requirements of the meningococcus. *J. Bacteriol.*, 43 (6): 757-61, 1942.
17. GEISELER, P.J.; NELSON, K.E.; LEVIN, S.; REDDI, K.T. & MOSES, V.K. – Community acquired purulent meningitis: a review of 1,316 cases during the antibiotic era, 1954-1976. *Rev. infect. Dis.*, 2(5):725-44, 1980.
18. GONZALES, A.F. – Consideraciones sobre diagnóstico de las meningites, por análisis del L.C.R. *Rev. Sanid. Hig. publ.*, 45(6):659-72, 1971.
19. GREENWOOD, B.M. & WHITTLE, H.C. – Antigen-negative meningitis due to group A *Neisseria meningitidis*. *J. infect. Dis.*, 129 (2):201, 1974.

20. GREENWOOD, B.M.; WHITTLE, H.C. & DOWNIC, O.R. - Countercurrent immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *Lancet*, 2(7723):519, 1971.
21. HAGGERTY, R.J. & ZIAI, M. - Acute bacterial meningitis. *Adv. Pediat.*, 13:129-81, 1964.
22. HYSLOP, N.E. & SWARTZ, M.N. - Bacterial meningitis. *Postgrad. Med.*, 58(3):120-8, 1975.
23. INGRAN, D.L.; ANDERSON, P. & SMITH, D.H. - Countercurrent immunoelectrophoresis in the diagnosis of systemic disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. *J. Pediat.*, 81:1156-59, 1972.
24. JARVIS, C.W. & SAXENA, K.M. - Does prior antibiotic treatment hamper the diagnosis of acute bacterial meningitis? An analysis of a series of 135 childhood cases. *Clin. Pediat.*, 11(4):201-4, 1972.
25. JONES, R.G. - Bacterial meningitis. Part. I. Incidence and diagnosis. *S. Afr. med. J.*, 41:75-9, 1967.
26. JOYNER, R.W.; IDRIS, Z.H. & WILFERT, C.M. Misinterpretation of cerebrospinal fluid Gram stain. *Pediatrics*, 54(3):360, 1974.
27. 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.*, 19(2):187-90, 1984.
28. LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSER JR., W.J. & TRUANT, J.P. - *Manual of clinical microbiology*. 3. ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1980. 1,044 p.
29. LEWIN, E.B. - Partially treated meningitis. *Amer. J. Dis. Child.*, 128: 145-7, 1974.
30. LORIAN, V. & ATKINSON, B. - Abnormal forms of bacteria produced by antibiotics. *Amer. J. clin. Pathol.*, 64(2):678-88, 1975.
31. LORIA, D.; KAMINSKI, T.; GRIECO, M. & SINGER, J. - Aberrant forms of bacteria and fungi found in blood or cerebrospinal fluid. *Arch. intern. Med.*, 124:39-48, 1969.
32. MANDAL, B.K. - The dilemma of partially treated bacterial meningitis. *Scand. J. infect. Dis.*, 8(3):185, 1976.
33. MELLES, C.E.A.; RAMIRES, M.R.N.; DINIZ, J.M.P.; ADELINO, M.G.F.; TAUNAY, A.E. & ROSSI, C.V. - Estudo comparativo de métodos diagnósticos das meningites purulentas. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 20(4): 202-7, 1978.
34. MILLAN, Y.; MENARD, M. & VANDEKERKOVE, M. - Isolement des meningocoques de sérotype A: influence de la durée et des conditions de conservation des liquides céphalorachidiens sur les résultats des cultures. *Bull. Org. mond. Santé*, 43(5): 743-9, 1970.
35. MITCHELL, M.S. - Immunofluorescent techniques for demonstrating bacterial pathogens associated with cerebrospinal meningitis II - Growth, viability and immunofluorescent staining of *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* and *Diplococcus pneumoniae* in cerebrospinal fluid. *J. Lab. clin. Med.*, 65(6):990-1003, 1965.
36. MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.A. & SWANN, M.B.R. - A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.*, 29(4): 407-15, 1926.
37. MUSER, D.M. & SCHELL, R.F. - False-positive Gram stains of cerebrospinal fluid. *Ann. intern. Med.*, 79(4):603-4, 1973.
38. PALHARES, M.; GELLI, D.S.; ALMEIDA, M.C.R.; MELLES, C.E.A.; TAKEDA, A.K. & TAUNAY, A.E. - Pesquisa de polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* do grupo C no líquido-céfalorraquidiano por imunoeletroforese cruzada em acetato de celulose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33:85-9, 1973.
39. PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A.E. - Detecção de Ags polissacarídeos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em LCR pela imunoeletroforese. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42-1982.
40. RORKE, E.M. - Valuable but neglected technique for the culture of aerobic organisms from cerebrospinal fluid. *J. clin. Pathol.*, 18:385, 1965.
41. TAKEDA, A.K.; UMEKITA, L.F.; BOSCARDIN, N.B.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A.E. - Imunoeletroforese cruzada no diagnóstico da meningite por *Haemophilus influenzae* tipo b. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(2):165-9, 1979.
42. TOBIN, B.M. & JONES, D.M. - Immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *J. clin. Pathol.*, 25:583, 1972.
43. WELLMAN, W.E. - Bacterial meningitis. *Postgrad. Med.*, 42:7-14, 1967.
44. WENSTEIN, R.A.; BANER, F.W.; HOFFMAN, R.D.; TYLER, P.G.; ANDERSON, R.L. & STAMM, W.E. - Factitious meningitis: diagnostic error due to nonviable bacteria in commercial lumbar puncture trays. *J. amer. med. Assoc.*, 233(8):878-9, 1975.
45. WILSON, F.M. & LERNER, A.M. - Etiology and mortality of purulent meningitis at the Detroit receiving hospital. *New Engl. J. Med.*, 271(24): 1235-38, 1964.

