

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ANA LETÍCIA GONÇALVES PEREIRA

**IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA INVESTIGAÇÃO
DE MENINGITE BACTERIANA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA DA
LITERATURA**

JUAZEIRO DO NORTE-CE
2021

ANA LETÍCIA GONÇALVES PEREIRA

**IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA A INVESTIGAÇÃO DE
MENINGITE BACTERIANA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo científico, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Dra. Jennifer Figueiredo da Silva Oliveira

ANA LETÍCIA GONÇALVES PEREIRA

**IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA A INVESTIGAÇÃO DE
MENINGITE BACTERIANA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo científico,
apresentado à Coordenação do Curso de Graduação
em Biomedicina do Centro Universitário Leão
Sampaio, em cumprimento às exigências para a
obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Dra. Jennifer Figueiredo da Silva
Oliveira

Data de aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof(a): Dra. Jennifer Figueiredo da Silva Oliveira
(Orientador)

Prof(a): Dra. Inês Maria Barbosa Nunes Queiroga
((Examinador 1)

Prof(a):Esp.. Ana Letícia Moreira Silva
(Examinador 2)

IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA A INVESTIGAÇÃO DE MENINGITE BACTERIANA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA

Ana Letícia Gonçalves Pereira¹
Jennifer Figueiredo da Silva Oliveira²

RESUMO

O objetivo deste estudo é de realizar uma revisão bibliográfica sobre a importância da Reação Em Cadeia da Polimerase (PCR) como método diagnóstico da Meningite Bacteriana. Para a elaboração desse estudo, a pesquisa bibliográfica se deu entre o período de Agosto de 2020 e maio de 2021, abrangendo os artigos publicados entre os anos de 2010 a 2021. A literatura analisada foi obtida em bases de dados científicos como PUBMED, SCIELO e Google Acadêmico utilizando os descritores “Meningite bacteriana”, “diagnóstico”, “exames”, “PCR”. A Meningite Bacteriana se tornou um grande problema em países em desenvolvimento, devido situações de saúde e higiene precárias, facilitando o surgimento e disseminação da doença, dificultando seu diagnóstico e tratamento. A diferenciação entre os tipos de meningite, bacteriana e asséptica, é de suma importância clínica no atendimento inicial de crianças com meningite. Os métodos de diagnóstico mais utilizados são cultura, exame quimiofisiológico do LCR, bacterioscopia direta, aglutinação pelo látex e PCR. A maioria possui limitações, principalmente quando o paciente já está realizando o tratamento com antibióticos. Infecções do sistema nervoso central (SNC) estão relacionadas com consideráveis taxas de morbidade e mortalidade levando em diversos casos a consequências sérias. É importante destacar que um diagnóstico rápido e preciso em um paciente suspeito de meningite bacteriana garante uma terapia medicamentosa rápida e eficaz, reduzindo as taxas de mortalidade da doença. Diante disso, por se tratar de uma técnica que não é realizada na rotina de todos os laboratórios é recomendável uma padronização para sua utilização. Financiamento governamental ou privado é muito importante para que possa ocorrer mais pesquisas nesse campo e essa técnica seja aprimorada, trazendo maior rapidez e confiabilidade para essa técnica.

Palavras-chave: Infecção. Bactéria; Meninges. Exame Complementar. PCR.

ABSTRACT

The aim of this study is to carry out a literature review on the importance of Polymerase Chain Reaction (PCR) as a diagnostic method for Bacterial Meningitis. For the preparation of this study, the bibliographic research took place between the period of August 2020 and May 2021, covering articles published between the years 2010 to 2021. The literature analyzed was obtained from scientific databases such as PUBMED, SCIELO and Academic Google using the descriptors “Bacterial meningitis”, “diagnosis”, “exams”, “PCR”. Bacterial Meningitis has become a major problem in developing countries, due to precarious health and hygiene situations, facilitating the emergence and spread of the disease, making its diagnosis and treatment difficult. The differentiation between the types of meningitis, bacterial and aseptic, it is of paramount clinical importance in the initial care of children with meningitis. The most used diagnostic methods are culture, CSF chemocytological examination, direct bacterioscopy, latex agglutination and PCR. Most have limitations, especially when the

patient is already undergoing treatment with antibiotics. Central nervous system (CNS) infections are associated

with considerable rates of morbidity and mortality, leading in many cases to serious consequences. It is important to highlight that a quick and accurate diagnosis in a patient suspected of bacterial meningitis guarantees a fast and effective drug therapy, reducing the disease's mortality rates. Therefore, as it is a technique that is not routinely performed in all laboratories, it is recommended to standardize its use. Government or private funding is very important so that more research can take place in this field and this technique is improved, bringing greater speed and reliability to this technique.

Key words: Infection. Bacterium; Meninges. Complementary Examination. PCR.

1. INTRODUÇÃO

A meningite ocorre devido a um processo inflamatório das meninges, membranas de tecido conjuntivo que revestem o encéfalo e medula espinhal, chamadas de dura-máter, aracnóide e pia-máter. As meningites estão mais associadas ao processo inflamatório da pia-máter, membrana mais interna e vascularizada. Entre a camada aracnóide e a pia-máter contém o líquido cefalorraquidiano que flui entre as meninges, preenchendo as cavidades intracerebrais funcionando como amortecedor do cérebro e medula espinhal (PEREIRA, 2014).

Meningites apresentam várias etiologias, podendo ser causadas pela penetração de diversos patógenos na túnica cerebral, entre as camadas das meninges. Vírus, bactérias, fungos e protozoários são os mais conhecidos agentes etiológicos causadores de meningite, além disso, podem ocorrer secundariamente à tumores ou substâncias químicas. As bactérias são importantes causadoras de meningites, com destaque para as espécies *Neisseria meningitidis* (meningococo), *Haemophilus influenzae tipo b* (Hib) e *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) (BELOGUROV et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2018).

De acordo com o grau de danos e comprometimento das camadas cerebrais, os sintomas podem variar de dores de cabeça, náuseas e vômitos, até quadros mais graves como convulsões, paralisias, tremores, podendo resultar em casos fulminantes. A transmissão da doença se dá por meio de vias respiratórias ou gotículas e secreções da nasofaringe, sendo necessário contato direto com esses meios de infecção. O período de incubação normalmente varia entre 2 a 10 dias, podendo ter alterações de acordo com a idade do paciente, condições do sistema imunológico e se não está associado a outros tipos de enfermidade que provoquem avanço e agravo da doença (PAULA et al., 2013).

As meningites bacterianas são um considerável desafio à saúde pública por sua taxa significativa de morbidade e mortalidade. As bactérias *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus*

influenzae tipo b (Hib) e o *Streptococcus pneumoniae* são causadoras de cerca de 90% dos casos de meningites (SALGADO et al., 2012).

As vias de cura e tratamento da meningite bacteriana e viral são diferentes, por isso o diagnóstico diferencial deve ser realizado de maneira urgente. A meningite bacteriana pode e deve ser diagnosticada e confirmada com um conjunto de exames para assim garantir maior confiabilidade (BELOGUROV et al., 2016).

Várias técnicas laboratoriais podem ser empregadas para realização do diagnóstico da meningite bacteriana, como exame quimiocitológico de líquido a bacterioscopia direta (líquor e outros fluidos), cultura, contra-immunoelectroforese cruzada – CIE (líquor e soro) e aglutinação pelo látex. Existe ainda a Reação da Cadeia de Polimerase (PCR), uma técnica empregada no campo da biologia molecular que realiza detecção do material genético bacteriano, viral ou fúngico, tornando-se ainda mais precisa e específica (FUKASAWA et al., 2010; FUKASAWA et al., 2012).

Dessa maneira, é de grande relevância aprofundar os conhecimentos sobre a eficácia da PCR como método diagnóstico da Meningite Bacteriana. Diante disso, torna-se importante a realização de estudos nesse campo e seu aprofundamento nas técnicas moleculares, pois tais técnicas são de alta especificidade e sensibilidade, contribuindo também para aumento do conhecimento científico dos alunos e profissionais da área da saúde, assim como toda a comunidade acadêmica.

Para a elaboração desse estudo, a pesquisa bibliográfica ocorreu entre o período de agosto de 2020 e maio de 2021, abrangendo os artigos publicados entre os anos de 2010 e 2021. A literatura analisada foi obtida em bases de dados científicos como PUBMED, SCIELO e Google Acadêmico utilizando os descritores Meningite bacteriana, diagnóstico, exames, PCR, assim como os mesmos em pares e trios obtidos no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde), além de buscas manuais através de referências constantes nos artigos encontrados nas bases eletrônicas.

A fim de especificar o máximo possível a revisão de literatura, foram considerados para critérios de inclusão artigos científicos publicados em português e inglês, relatos de caso, revisões da literatura e pesquisas, assim como o período de tempo entre 2010 e 2021. Análise mais acurada foi realizada a partir dos resumos com foco nos objetivos propostos pelo estudo. Os objetivos apresentados, não trazendo a proposta que se enquadrava ao tema do presente trabalho foram excluídos.

Além disso, foram desconsiderados comentários da literatura, cartas ao editor, resumos de congressos, resumos estendidos, trabalhos que não mantinham relação com o tema abordado e fora da linha de estudo de interesse.

Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi de realizar uma revisão bibliográfica sobre a importância da PCR como método diagnóstico da Meningite Bacteriana.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 MENINGITE: ASPECTOS GERAIS

Desde o ano de 1805 foi descrita a sintomatologia da meningite em um surto na cidade de Genebra. Até os dias atuais muitas informações foram descobertas sobre a doença, como os micro-organismos causadores, o diagnóstico e tratamento mais adequado. Os sintomas da doença variam de acordo com a idade, mas possuem consistência em alguns sintomas específicos, como nível alterado de consciência, convulsões, rashpurpúrico, petéquias e rigidez de nuca. Porém, apenas a sintomatologia clínica não fecha o diagnóstico, por isso a importância de exames laboratoriais específicos (SILVA et al., 2017).

A meningite bacteriana é uma das doenças transmissíveis mais graves, associadas a taxas numerosas de morbidade e mortalidade. Cerca de 10 a 20% dos sobreviventes acabam desenvolvendo complicações biológicas, exigindo o diagnóstico e tratamento imediato. Observa-se que a incidência de meningite é geralmente alta em países em desenvolvimento, com baixas condições socioeconômicas (KHATER; ELABD, 2016).

Infecções do sistema nervoso central (SNC) estão relacionadas com consideráveis taxas de morbidade e mortalidade levando em diversos casos a consequências sérias. Para determinar um diagnóstico apropriado é importante que os médicos estejam habituados com os sinais e sintomas de infecções que afetam o SNC (TARAI; DAS, 2018).

Após o contato com o agente infeccioso, a bactéria se aloja na nasofaringe e inicia a colonização. A replicação bacteriana atinge o espaço que existe entre a camada aracnóide e pia-máter, denominado espaço subaracnóideo que é preenchido por líquido. Nesse local ocorre a liberação de componentes bacterianos que atingem o endotélio cerebral, estimulando assim a liberação de citocinas e um processo inflamatório se instala, causando aumento da permeabilidade vascular, da resistência do fluxo líquido e edema vasogênico. Todos esses eventos provocam aumento da pressão intracraniana, redução do fluxo cerebral e perda da auto-regulação cerebrovascular (TEIXEIRA, 2018).

A meningite viral normalmente possui uma evolução clínica mais leve e menos letal do que a bacteriana, havendo casos relatados de cura espontânea. Por outro lado, a meningite bacteriana possui curso clínico mais rápido e agressivo, tendo as maiores taxas de mortalidade (BELOGUROV et al., 2016).

Já a presença de fungo nas meninges pode levar o paciente a desenvolver meningite fúngica, sendo a *Candida albicans* a levedura mais comum no desenvolvimento desse tipo de meningite. Em torno de 25% dos pacientes que desenvolvem a meningite fúngica por *Candida albicans* tem envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), com quadros de candidíase sistêmica, sendo mais comum em recém-nascidos entre a segunda e sexta semana de vida.

Por outro lado, um dos fungos mais comumente encontrados no SNC e com alto índice de desenvolvimento dessa doença é o *Cryptococcus neoformans* e sua forma de infecção é através das vias aéreas, caindo na corrente sanguínea e se disseminando por outras partes do corpo, principalmente, cérebro e meninges. (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012; LEITE et al., 2016)

Os mecanismos que levam a colonização dos micro-organismos ainda são pouco compreendidos, mas se sabe que fatores de virulência meningocócica, condições ambientais e suscetibilidade do hospedeiro estão diretamente ligados ao desenvolvimento das meningites. O principal motivo das manifestações clínicas é a extensão da ativação da resposta imune inata e adquirida do hospedeiro, pois o mesmo é afetado por uma gama de fatores, como a quantidade de endotoxina circulante e carga bacteriana. Ainda, problemas genéticos em constituintes do sistema complemento podem culminar numa resposta inflamatória e cascatas de coagulação e fibrinólise que elevam a susceptibilidade, a gravidade, afetando o prognóstico do indivíduo infectado (STRELOW e VIDAL, 2013).

A diferenciação entre os tipos de meningite, bacteriana e asséptica, é de suma importância clínica no atendimento inicial do paciente. Vários testes têm sido desenvolvidos com o intuito de facilitar e garantir essa diferenciação. Em casos de meningite bacteriana, a internação e início imediato da antibioticoterapia reduzem muito os riscos de agravamento clínico e taxas de mortalidade. Já na meningite asséptica, na maioria dos casos causadas por vírus, são necessárias apenas medidas de suporte (PIRES et al., 2017).

No entanto a meningite asséptica é definida desse modo quando as proteções cerebrais são vencidas e o crânio, meninges e até a barreira hematoencefálica são acometidos pelo patógeno, tendo como fatores predisponentes Diabetes Mellitus, otite média, abuso de álcool ou drogas. Seu diagnóstico se torna um verdadeiro desafio clínico, pois suas características se confundem muito com a meningite bacteriana, sendo de vital importância as informações

obtidas através do exame de LCR. Porém, quando no início da doença, tais resultados separados não são suficientes para fechar tal diagnóstico, sendo necessário sua correlação com outras informações fornecidas pelo paciente no momento da anamnese e exame físico (DAMIANI, FURLAN, DAMIANI, 2012).

2.2 PRINCIPAIS BACTÉRIAS QUE PODEM CAUSAR A MENINGITE

A doença meningocócica invasiva é endêmica no Brasil, com ocorrência periódica de surtos em várias cidades. O principal agente etiológico de meningite em crianças não neonatais e em adultos jovens é a bactéria *N. meningitidis*. Trata-se de uma bactéria de colonização exclusiva humana que possui como características ser um diplococo gram-negativo, frequente na nasofaringe e orofaringe, mas também pode ser encontrada em outros locais, como a mucosa oral, reto e trato urogenital. Existem 13 sorogrupos conhecidos, mas apenas 6 causam a maioria das doenças com risco de vida (STRELOW e VIDAL, 2013).

As bactérias *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* também são agentes etiológicos da meningite, consideradas fastidiosas, culminando em resultados dos exames laboratoriais inconclusivos, principalmente devido a coleta, o manuseio e o encaminhamento da amostra de forma inadequada, assim como o uso prévio de antibióticos pelo paciente (MEIRELLES et al., 2011).

Streptococcus pneumoniae, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* tipo *b* são os agentes responsáveis pela maioria dos casos documentados no mundo de bactérias causadoras de meningite. Contudo, na última década, as mudanças na epidemiologia da doença relacionadas à distribuição dos agentes causais e a faixa etária dos pacientes foram observadas em diferentes áreas geográficas, em razão da implementação de diferentes estratégias de imunização utilizando vacinas polissacarídicas (KHATER; ELABD, 2016).

Streptococcus pneumoniae, *Streptococcus agalactiae* (grupo *B Streptococcus*), *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* (particularmente o sorotipo K1) são os patógenos bacterianos mais comuns de infecções agudas presentes no SNC (TARAI; DAS, 2018).

As meningites bacterianas agudas são importante causa de morbimortalidade na infância. Entre as bactérias causadoras, está a gram negativa *Haemophilus influenzae* que em indivíduos saudáveis coloniza de forma assintomática e eventualmente provoca doenças sistêmicas e infecções das mucosas. Determinadas espécies de *Haemophilus* fazem parte da microbiota do sistema respiratório superior dos seres humanos, sendo mais comum a espécie *H. influenzae*. Identificam-se seis sorotipos capsulares distintos de *H. influenzae* designados

de “a” até “f” que podem ser detectados com base no antígeno específico presente em suas cápsulas. Esse tipo bacteriano tem sido objeto de interesse crescente devido à gravidade e sequelas causadas pela doença (SCHOSSLER et al., 2013).

O quadro abaixo traz um resumo das principais bactérias causadoras da meningite e os autores utilizados.

Quadro 1. Principais bactérias causadoras da Meningite Bacteriana

Bactérias	Informações relevantes	Autores
<i>N. meningitidis.</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Diplococo gram-negativo; • Frequente na nasofaringe e orofaringe • Podem também serem encontradas na mucosa oral, reto e trato urogenital • 13 sorogrupos conhecidos, apenas 6 causam a maioria das doenças com risco de vida 	STRELOW e VIDAL, 2013.
<i>S. pneumoniae</i> <i>N. meningitidis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Consideradas fastidiosas • Culminam em resultados dos exames laboratoriais inconclusivos devido: <ul style="list-style-type: none"> • A coleta • O manuseio • O encaminhamento • Uso prévio de antibióticos pelo paciente 	MEIRELLES et al., 2011.
<i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B <i>Streptococcus</i>), <i>Escherichia coli</i> (particularmente o sorotipo K1)	<ul style="list-style-type: none"> • Responsáveis pela maioria dos casos documentados no mundo; • Patógenos bacterianos mais comuns de infecções agudas presentes no SNC; 	KHATER; ELABD, 2016. TARAI; DAS, 2018.
<i>Haemophilus influenzae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fazem parte da microbiota do sistema respiratório superior dos seres humanos; • Identificam-se seis sorotipos capsulares distintos designados de “a” até “f”; • Podem ser detectados com base no antígeno específico presente em suas cápsulas; • Objeto de interesse crescente devido à gravidade e sequelas causadas pela doença. 	SCHOSSLER et al., 2013.

2.3 DIAGNÓSTICO DE MENINGITE

No Brasil, a meningite é uma doença de notificação obrigatória em até 24 horas. Atualmente seu diagnóstico "padrão ouro" é a cultura do LCR (CHRISTO, 2019).

A meningite bacteriana possui taxas mais altas de morbidez e mortalidade do que a meningite viral. O atraso no diagnóstico e terapia medicamentosa podem elevar muito mais esses índices, isso devido ao seu rápido progresso clínico. Uma avaliação clínica adequada e realização de exames de diagnóstico confiáveis são de suma importância (NAZIR et al., 2018).

Os métodos de diagnóstico mais utilizados são cultura, exame quimiocitológico do LCR, bacterioscopia direta, aglutinação pelo látex e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A maioria possui limitações, principalmente quando o paciente já está realizando o tratamento com antibióticos (TEIXEIRA, 2018).

O diagnóstico tradicional é realizado por meio de coleta e análise de LCR através de marcadores específicos como contagem de leucócitos, açúcar, proteína, coloração de gram e isolamento bacteriano (NAZIR et al., 2018). Também pode ser feito por meio de exames de LCR, com o líquido colhido por punção lombar e analisado através de um conjunto de testes bacteriológicos que isolam e identificam a bactéria causadora, sendo preferencialmente recomendada a coleta antes de tratamento antimicrobiano (SZTAJNBOK, 2012). Estes testes apresentam relativa sensibilidade e especificidade, com falhas no diagnóstico e ainda consomem muito tempo (TARAI; DAS, 2018).

É importante destacar que um diagnóstico rápido e preciso em um paciente suspeito de meningite bacteriana garante uma terapia medicamentosa rápida e eficaz, reduzindo as taxas de mortalidade da doença (ALMEIDA et al., 2019).

Outros exames como teste de aglutinação de látex e PCR são meios complementares que podem ajudar no diagnóstico etiológico, especialmente para pacientes que apresentem culturas bacteriológicas de LCR negativas ou após o início do tratamento com antibióticos. Recentemente houve uma troca da cultura de LCR para PCR como principal método de detecção de patógenos. Isso se deve a capacidade do exame de detectar vários patógenos com um único exame, a exemplo do multiplex PCR (CHRISTO, 2019).

O primeiro painel molecular para diagnóstico de meningite/encefalite autorizado pelo Food and Drug Administration (FDA) pode pesquisar na análise do líquido cefalorraquidiano 14 alvos simultaneamente, incluindo 6 bactérias (*Escherichia coli* K1, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*,

Streptococcus pneumoniae), sete vírus (citomegalovírus, enterovírus, vírus herpes simplex 1 (HSV-1), HSV-2, herpes vírus humano 6 (HHV-6), humano parechovirus (HPeV), vírus varicella zoster (VZV)) e uma levedura (*Cryptococcus neoformans / gatii*) (GRAF; FARQUHARSON; CÁRDENAS, 2016).

Sugere-se que a utilização de técnica molecular no diagnóstico de meningite bacteriana deve ser pensada em casos suspeitos com resultados de cultura negativa antes de comunicar a exclusão da doença (KHATER; ELABD, 2016).

As vias de cura e tratamento da meningite bacteriana e viral são diferentes, por isso o diagnóstico diferencial deve ser realizado de maneira urgente. A meningite bacteriana pode e deve ser diagnosticada e confirmada com um conjunto de exames, para assim garantir maior confiabilidade (BELOGUROV et al., 2016).

Após confirmação dos casos, eles são devidamente classificados como doença meningocócica, meningite tuberculosa, meningite por outra bactéria, meningite não especificada, meningite asséptica, meningite devido a outra etiologia, meningite por *Haemophilus* e meningite por *Pneumococo*. Referente aos casos de meningite não especificada, é importante o desenvolvimento de novos exames de identificação e diagnóstico do agente causador (CHRISTO, 2019).

Quadro 2. Técnicas laboratoriais mais utilizadas no diagnóstico de Meningite Bacteriana.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MAIS UTILIZADOS		
Cultura	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnóstico tradicional • Feito através de marcadores específicos • Contagem de leucócitos, <ul style="list-style-type: none"> • Açúcar, proteína, • Coloração de gram • Isolamento bacteriano • Apresentam relativa sensibilidade e especificidade; • Apresentam falhas no diagnóstico e ainda consomem muito tempo • Mesmo com suas limitações ainda é utilizada como padrão ouro na rotina laboratorial para detecção de meningite e encefalite. 	(NAZIR et al., 2018). (SZTAJNBOK, 2012).
Exame quimiocitológico do LCR	<ul style="list-style-type: none"> • Atualmente seu diagnóstico "padrão ouro" 	(CHRISTO, 2019).

Bacterioscopia direta	<ul style="list-style-type: none"> • Possui limitações, principalmente quando o paciente já está realizando o tratamento com antibióticos 	(SZTAJNBOK, 2012).
Aglutinação pelo látex e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).	<ul style="list-style-type: none"> • Apresentam meios complementares que podem ajudar no diagnóstico etiológico junto a culturas bacteriológicas de LCR negativas ou após o início do tratamento com antibióticos. • Recentemente houve uma troca da cultura de LCR para PCR como principal método de detecção de patógenos. 	(CHRISTO, 2019).

2.3.1 EXAME QUIMIOCITOLÓGICO DE LÍQUOR E BACTERIOSCOPIA DIRETA (LÍQUOR E OUTROS FLUIDOS)

Uma técnica preliminar mais rápida é o esfregaço do LCR associado a coloração de gram para o diagnóstico em 60-90% de pacientes que se correlaciona com a concentração de bactérias nas amostras do LCR, porém a sensibilidade de LCR com a coloração de gram varia consideravelmente para diferentes tipos de micro-organismos. Observa-se também que alguns estudos relataram uma baixa sensibilidade de ensaios de detecção de antígeno como teste de aglutinação de látex, particularmente em pacientes pré-tratados com antibioticoterapia antes da realização da punção lombar. Deste modo, métodos moleculares foram propostos para suprir as necessidades, como métodos rápidos e precisos, especialmente em situações em que o paciente apresenta cultura negativa (KHATER; ELABD, 2016).

Os testes de diagnóstico padrão são iniciados com duas hemoculturas, dosagem de hemoglobina, contagem diferencial de plaquetas e teste de coagulação. Diante de um caso suspeito de doença meningocócica invasiva é obrigatória a análise do LCR, não sendo obrigatória sua associação com uma tomografia computadorizada do cérebro. Características clássicas do líquido cefalorraquidiano em qualquer infecção de meningite aguda estão presentes na maioria dos casos de meningococos meningite: pleocitose (geralmente > 1000 células / mL e > 80% de polimorfonuclear), redução dos níveis de glicose e proteína elevada (acima de 50 mg / dL) (STRELOW e VIDAL, 2013).

Já segundo Sztajnbok (2012) o exame de líquido (LCR) é fundamental para o diagnóstico de meningite bacteriana, pois a partir desse exame é realizada a análise de citologia e citometria, glicose e proteína, gram e cultura, pesquisa de antígenos e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O autor ainda ressalta que hemoculturas são positivas para 80 a 90% dos casos, além da PCR e esfregaço que contribuem grandemente para o fechamento do

diagnóstico. Quando há uma elevada quantidade de pleocitose e proteína no líquido cefalorraquidiano, o diagnóstico de meningite bacteriana está confirmado.

A técnica de análise do LCR referente a contagem de leucócitos, nível de glicose e proteínas associado com a coloração de gram são métodos mais rápidos de investigação. Entretanto, esses processos sofrem de uma falta de especificidade. Já a técnica de cultura bacteriana pode oferecer um diagnóstico definitivo, todavia leva vários dias para se obter um resultado. Por possuírem um rápido tempo de resposta e alta sensibilidade, os diagnósticos moleculares têm capacidade para sobrepujar as limitações das técnicas atuais (GRAF; FARQUHARSON; CÁRDENAS, 2016).

A cultura bacteriana mesmo com suas limitações ainda é utilizada como padrão ouro na rotina laboratorial para detecção de meningite e encefalite. Uma das limitações é a demora na liberação e enquanto isso os pacientes são tratados com uma terapia de amplo espectro até a liberação do laudo. Outra limitação é a sua baixa sensibilidade, principalmente quando o paciente fez uso anteriormente de algum antibiótico. Devido a essas limitações ainda se possuem uma quantidade considerável de casos de meningite e encefalite sem solução e sem identificação do agente etiológico específico, resultando em um número expressivo de pacientes submetidos a terapia de amplo espectro. Demonstrando, portanto, a importância da utilização de novos meios de diagnóstico (BARD, NACCACHE, BENDER 2016).

Uma das técnicas utilizadas para diagnóstico é a coloração de gram, pois se trata de um método barato, amplamente disponível e pode ser positivo mesmo quando a cultura for negativa. Sua desvantagem é que a positividade cai ligeiramente quando se faz uso prévio da antibioticoterapia. A sensibilidade para a detecção de meningite meningocócica é de aproximadamente 75%, mas pode ser bastante variável, com resultados relatados entre 30% e 89% (STRELOW e VIDAL, 2013).

Para casos de pacientes pediátricos, a habilidade de testar agentes bacterianos e virais será extremamente útil e pode potencialmente permitir um uso mais específico de drogas antivirais e antibacterianas (TARAI; DAS, 2018).

2.3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NO DIAGNÓSTICO DE MENINGITE

Métodos rápidos como a coloração de gram, teste de aglutinação de látex e cultura bacteriana estão disponíveis para determinados agentes bacterianos, mas não são suficientemente sensíveis, podendo ter alterações nos resultados quando se ocorrem erros no

processo pré-analítico, reduzindo a confiabilidade do resultado. Outro problema com estes testes se dá devido a maioria dos pacientes estarem sendo tratados com terapia de antibióticos durante a coleta da amostra, comprometendo assim o resultado. Devido a esses problemas, cerca de 50% dos casos suspeitos de meningite bacteriana não são confirmados por exames de cultura (ALMEIDA, 2019).

Com isso, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tem sido cada vez mais utilizada no diagnóstico de meningite, sendo extremamente útil quando a coloração de Gram, cultura e aglutinação de látex são negativos. O resultado da PCR não sofre interferência da antibioticoterapia, pode-se realizar teste simultâneo para *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, além disso, apresenta resultados mais rápidos que a cultura, com sua sensibilidade entre 89-100% e especificidade entre 95-100% (STRELOW e VIDAL, 2013).

A PCR (Reação em Cadeia Polimerase) realiza a detecção do material genético bacteriano, viral ou fúngico. Em um estudo realizado por Oliveira et al. (2012) foi observado que a técnica PCR-TR (Reação em cadeia da polimerase-tempo real) pode ser utilizada aliada a cultura bacteriana do líquido, tornando muito mais eficiente e confiável o diagnóstico específico das meningites associadas ao *Staphylococcus aureus*. Por se tratar de um agente etiológico não muito comum na causa da meningite, foi observada que sua taxa de letalidade é mais elevada quando comparada a outros agentes mais comuns. O estudo mostrou que não ocorreram problemas na metodologia da técnica utilizada para análise, tornando assim um meio válido e sem interferências das amostras e o diagnóstico preciso.

De acordo com Salgado et al. (2013) a PCR em Tempo Real (PCR-TR) apresenta uma modificação da técnica tradicional buscando identificar o DNA bacteriano, apresentando uma especificidade e sensibilidade maior com um menor tempo de reação, podendo realizar a sua detecção e amplificação de forma simultânea em um sistema fechado. Esse sistema funciona a partir da metodologia do TaqMan que se baseia na detecção e quantificação do sinal fluorescente aumentando a proporção direta da reação de PCR. Ainda segundo os autores, esse ciclo amplificado tem um sinal que cruza o *threshold* chamado de *cyclethreshold* ou Ct.

As vantagens da técnica de PCR em comparação a outros exames é que a técnica sofre menos alterações em relação às condições da amostra. O resultado é emitido mais rapidamente do que uma cultura bacteriana que pode demorar de 2 a 3 dias. Alguns testes pontuais usando multiplex PCR foram desenvolvidos, mas ainda necessitam de uma padronização e avaliação de custo-benefício, para serem mais utilizados na rotina laboratorial. A técnica de multiplex PCR mostrou ter um alta especificidade e valor preditivo negativo,

demonstrando seu diferencial em relação a outras técnicas e a sua utilidade em um ambiente clínico (CHRISTO, 2019).

O Instituto Adolfo Lutz que é o laboratório de Referência Nacional para meningite bacteriana implementou e validou um ensaio “triplex” de PCR em tempo-real (PCR-TR) para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas causadas por *N. meningitidis*, *S.pneumoniae* e *H. influenzae*. O ensaio desenvolvido no Instituto Adolfo Lutz é composto por três pares de iniciadores e suas sondas, cujos alvos genéticos estão organizados no quadro 3.

Quadro 3. Ensaio Triplex de PCR em Tempo Real (PCR-TR) implementado e validado pelo Instituto Adolfo Lutz.

Gene	Resultados do ensaio/estudo	Adicional
<p>ctr A</p> <p>Responsável pelo transporte da cápsula <i>N. meningitidis</i>.</p>	<p>SENSIBILIDADE de 100% (95% intervalo de confiança,</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 96,0% a 100%) para <i>N. meningitidis</i>; ● 97,8% (88,5% a 99,9%) para <i>S. pneumoniae</i>; ● 66,7% (9,4% a 99,2%) para <i>H. influenzae</i>. <p>ESPECIFICIDADE (98,9% a 100%.)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● A inclusão do ensaio na rotina diagnóstica das meningites bacterianas aumentou a constatação de casos de <i>S. pneumoniae</i>, <i>N. meningitidis</i> e <i>H. influenzae</i> em 52%, 85% e 20%, respectivamente, em relação à cultura; ● No ano de 2011 um novo ensaio para detectar casos por <i>H. influenzae</i> pertencentes a qualquer um dos seis sorotipos e inclusive os <i>H. influenzae</i> não tipáveis, foi proposto tendo o gene <i>hpd</i>, responsável pela proteína D de <i>H. influenzae</i>, como gene alvo. A substituição do gene alvo <i>bexA</i> pelo <i>hpd</i> resultou em um ensaio com maior sensibilidade.
<p>lytA</p> <p>Responsável pela produção de autolisina de <i>S. pneumoniae</i></p>		
<p>bexA</p> <p>Responsável pela expressão capsular de <i>H. influenzae</i></p>	<p>SORO</p> <p>SENSIBILIDADE (57,1%; 80% e 0%, respectivamente)</p> <p>ESPECIFICIDADE variaram entre 94,1% a 100%</p>	

	LCR	
	Valores preditivos positivo e negativo variaram de 98,3% a 100% e 98,9% a 100%, respectivamente.	

(SALGADO et al., 2012).

Considerando a alta do número de casos de meningites bacterianas por *H. influenzae* não tipável no Brasil e a limitação do ensaio “triplex” em detectar cepas de *H. influenzae* dos sorotipos “e”, “f” e *H. Influenzae* não tipável, houve a necessidade de remodelação do componente para *H. influenzae* no ensaio “triplex” da PCR-TR onde o alvo genético *bexA* foi substituído pelo gene *hpd* (SALGADO et al., 2012).

O painel molecular *The Film Array Meningitis/Encephalitis* foi aprovado pelos EUA *Food and Drug Administration (FDA)* em 2015. A técnica do tipo multiplex deriva-se da PCR e possibilita a detecção de vários patógenos ao mesmo tempo, podendo ser fúngicos, virais e bacterianos. Outra característica de destaque é a sua sensibilidade em comparação a outras técnicas como a cultura de LCR. A técnica tem possibilidade de ser utilizada para otimizar a liberação de um laudo confiável e rápido em um caso de meningite e encefalite. Porém, por se tratar de um teste relativamente novo são necessários mais estudos para comprovar a sua sensibilidade e especificidade frente a outras técnicas (BARD, NACCACHE, BENDER 2016).

Atualmente o diagnóstico rotineiro tem a possibilidade de ser realizado usando moléculas baseadas em amplificação de ácido nucléico. Os ácidos nucléicos baseados na amplificação *in vitro* são um tipo de técnica molecular que tem maior sensibilidade e especificidade, e ainda demonstram maiores taxas de detecção quando comparados a métodos tradicionais. É possível encontrar quatro ensaios moleculares rápidos que são aprovados pela FDA com finalidade de detecção de patógenos no líquido cefalorraquidiano (LCR). O Ensaio *Xpert EV (Cepheid)* para a detecção de enterovírus, *Simplex HSV 1 e 2 Direct* (Diagnóstico de Foco) e *Kit Multi Code RTx HSV 1 e 2 (Luminex Corporation)* para detectar vírus herpes 1 e 2, e o painel *Film Array® ME (BioFire, bioMerieux, Salt Lake City, EUA)*, que atualmente é o único ensaio multiplex aprovado pela FDA para a detecção simultânea de fungos, bactérias e vírus no LCR. (TARAI; DAS, 2018)

O *Film Array® ME* se trata de uma das tecnologias mais recentes, que possibilita a detecção rápida de uma ampla gama de agentes infecciosos relacionados com as infecções do

SNC. A técnica utiliza uma plataforma de PCR multiplexada para a simultânea identificação de 14 patógenos no LCR. Além disso, apresenta excelente desempenho em relação à cultura e outros métodos laboratoriais de referência. O painel é baseado no princípio de PCR multiplex com detecção por análise da curva de fusão. Ele identifica adequadamente um número significativo de alvos e possui alta sensibilidade e especificidade quando comparado com as técnicas convencionais. Essa técnica pode ser realizada no período de 1 hora, o que pode reduzir significativamente o tempo necessário para diagnosticar o paciente (TARAI; DAS, 2018).

Diante do exposto, torna-se bastante relevante a padronização de técnicas de biologia molecular para identificar os principais agentes etiológicos causadores da meningite bacteriana (ALMEIDA, 2019).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A meningite bacteriana é uma doença que possui alta taxa de morbimortalidade com sintomas que podem variar, tornando o seu diagnóstico precoce de suma importância para conduzir uma terapia adequada. O diagnóstico molecular por meio da técnica de PCR é um meio de detecção que quando comparado a outras técnicas como cultura bacteriana, exame quimiofisiológico do LCR, bacterioscopia direta e aglutinação pelo látex, apresenta maior especificidade e sensibilidade, além de uma liberação de laudo mais rápida quando comparada a cultura bacteriana que atualmente é o padrão ouro de detecção, a exemplo do painel molecular de detecção aprovado pelo FDA, no qual se pode realizar a detecção de múltiplos micro-organismos, realizando assim uma pesquisa mais ampla.

Diante disso, por se tratar de uma técnica que não é realizada na rotina de todos os laboratórios, é recomendável uma padronização para sua utilização. Para tanto, é importante que financiamento governamental ou privado seja viabilizado para pesquisas nessa área, pois quanto maior o aprimoramento e mais precisa essa técnica se tornar, maior será a rapidez e confiabilidade do diagnóstico, otimizando terapêuticas, reduzindo tempo de internamento e aumentando as chances de cura para mais pacientes.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. M.; et al. Validation of multiplex PCR for the diagnosis of acute bacterial meningitis in culture negative cerebrospinal fluid (*Arq Neuropsiquiatr*) 2019;77(4):224-231

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde – Módulo VII Detecção e Identificação dos Fungos de importância Médica. São Paulo, 2012. 22 p. **Manual ANVISA**. Disponível em <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/introducao.pdf>

BARD, J.D; NACCACHE, S.N; BENDER, J.M. Use of a Molecular Panel to Aid in the Diagnosis of Culture-Negative Meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1- 6, 28/ setembro 2016.

BELOGUROV-JUNIOR, A. A.: et al. Mediators and Biomarkers of Inflammation in Meningitis: Cytokine and Peptide Profiling of Cerebrospinal Fluid (**BIOCHEMISTRY** (Moscou)) 2016; v.81, n.11: 1540-1552.

CHRISTO, P. P. “Time is brain” also for bacterial meningitis”. **Arq Neuropsiquiatr** 2019; 77(4): 221---223.

DAMIANI, D; FURLAN, M. C.; DAMIANI, D. Meningite Aséptica. **Rev Bras Clin Med São Paulo**, 2012 jan-fev;10(1):46-50

FUKASAWA, L. O.; et al. Validação da técnica de contraímuno eletroforese (CIE) para o diagnóstico laboratorial das meningites causadas por *Neisseria meningitidis* sorogrupos A, B, C e W135. **Bepa**, 2012;09(102) 13—20

FUKASAWA, L. O.; et al. Limitações no uso da técnica de contraímuno eletroforese (CIE) para o diagnóstico das meningites causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b. **Bepa** 2010;7(76):4-12.

GRAF, E.H; FARQUHARSON, M.V; CÁRDENAS, A.M. Comparative Evaluation of the Film Array Meningitis/Encephalitis Molecular Panel in a Pediatric Population. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 1-12 2016.

KHATER, W.S; ELABD, S.H. Identification of Common Bacterial Pathogens Causing Meningitis in Culture-Negative Cerebrospinal Fluid Samples Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. **International Journal of Microbiology**, p. 1-5, 2016.

MEIRELLES, et al. Investigação de meningite por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil, utilizando métodos laboratoriais convencionais. **Bepa** 2011;8(85):15-22

NAZIR, M.; et al. Cerebrospinal fluid lactate: a differential biomarker for bacterial and viral meningitis in children. **J Pediatr** (Rio J). 2018;94:88-92.

OLIVEIRA, P. L.; et al. Uso da técnica de PCR em tempo real no diagnóstico etiológico das meningites bacterianas associadas ao *Staphylococcus aureus*. **Bepa** 2012;09(98) 4-11.

PAULA, J.; et al. **Complicações neurológicas e auditivas decorrentes da meningite bacteriana em neonatos**. Boa Sorte, BA – 2013. Disponível em: <<http://www.webartigos.com/artigos/complicacoes-neurologicas-e-auditivas-decorrentes-da-meningite-bacteriana-em-neonatos/116105/#ixzz4M9YEcabL>>.

PEREIRA, D. N. **Meningites Bacterianas**. Porto 2014. Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4837/1/PPG_21948.pdf>.

PIRES, F. R.; et al. Utilização de escore e dosagem de lactato no líquido para diagnóstico diferencial entre meningite bacteriana e meningite asséptica. **Rev Paul Pediatr**. 2017;35(4):369-374

SALGADO, et. al. Avaliação de resultados discrepantes obtidos na execução de PCR em tempo real em amostras de pacientes com suspeita clínica de meningite bacteriana. **RevInst Adolfo Lutz**. 2013; 72(2):161-4

SALGADO, M. M.; et al. Nova versão do ensaio da PCR em tempo real para o diagnóstico laboratorial e vigilância epidemiológica das meningites bacterianas. **BEPA**, v.103, p.16-20, 9; 2012.

SCHOSSLER, J.G.S.; et al. Incidência de meningite por Haemophilus influenzae no RS 1999-2010: impacto da cobertura vacinal. **Ciência e saúde coletiva**, 2013, p. 1451-1458.

SILVA, O. R. K. MENINGITES BACTERIANAS. **Revista Enfermagem e Saúde Coletiva**. (FSP) 2017. v2. n3. P40—52.

STRELOW L.V.; VIDAL, E. J. Doença meningocócica invasiva (**ArqNeuropsiquiatre**) 2013; 71 (9-B): 653---658

SZTAJNBOK, D. C. N. Meningite Bacteriana Aguda. **Revista de Pediatria SOPERJ** - v. 13, no 2, p72-76 dez 2012.

TARAI, B; DAS, P. FilmArray® meningitis/encephalitis (ME) panel, a rapid molecular platform for diagnosis of CNS infections in a tertiary care hospital in North India: one-and-half-year review. **Neurological Sciences**, p. 1 -8, 25 setembro 2018.

TEIXEIRA, A. B.; et al. MENINGITE BACTERIANA: uma atualização. **Revista brasileira de análises clínicas**. 2018 V.50 n.4 327-329