

PESQUISA DE POLISSACARÍDEOS DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*
DO GRUPO C NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO POR
IMUNOELETROFORESE CRUZADA EM ACETATO DE CELULOSE *

Mauri PALHARES **
Dilma Scala GELLI **
Maria Cecília Rossi de ALMEIDA **
Carmo Elias Andrade MELLIS **
Augusta Kiyomi TAKEDA **
Augusto de Escragnolle TAUNAY **

RIAL-A/389

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 imuno-
eletroforese cruzada em acetato de celulose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*,
33: 85-89, 1973.

RESUMO: Os resultados de exames bacteriológicos de 846 amostras de
líquido cefalorraquidiano provenientes de casos suspeitos de meningite bac-
teriana foram comparados com os fornecidos pela reação de imunoeletro-
forese cruzada em acetato de celulose. Nos casos em que foi isolada *Neisseria*
meningitidis do grupo C houve uma concordância de 83,06%. Nos casos de men-
ingites bacterianas não meningocócicas, a concordância foi de 99%, indi-
cando ser a reação bastante específica.

DESCRITORES: imunoeletroforese cruzada; *Neisseria meningitidis*, gru-
po C; meningite meningocócica; polissacarídeos bacterianos.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico de laboratório das meningites bacterianas pode apresentar dificuldades sempre que o agente etiológico não é demonstrado através das técnicas bacteriológicas usuais. Tal fato ocorre com maior frequência quando se trata de meningites meningocócicas onde nem sempre a bactéria é evidenciada ao exame direto nem se desenvolve nos meios habituais de cultivo, mesmo quando são utilizadas técnicas adequadas.

A demonstração da presença de antígenos bacterianos no líquido cefalorraquidiano (L.C.R.) de portadores de infecções meningéas foi tentada com êxito por diferentes autores. RAKE⁶ e MAEGRAITH⁵ obtiveram resultados bastante satisfatórios em casos de infecções meningocócicas através das reações de precipitação em tubos com soros anti-meningocócicos mono ou polivalentes.

COONROD & RYTEL¹, HOFFMAN & EDWARDS⁴, EDWARDS², e GREENWOOD *et alii*³ verificaram que os polissacarídeos da *N. me-*

* Realizado nas Seções de Imunologia e Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

ningitidis existentes no L.C.R., quando submetidos à passagem de uma corrente contínua, migram para o polo positivo deslocando-se até a região da pré-albumina, enquanto que os anticorpos migram para o polo negativo.

Utilizando a técnica da imunoelektroforese cruzada (E.F.C.) em agarose, puderam evidenciar a presença desses polissacarídeos que precipitam em presença de soros preparados em coelhos, tornando possível identificar, através de um anticorpo conhecido, o grupo sorológico a que pertence a bactéria responsável pela infecção.

No presente trabalho, o mesmo foi feito substituindo-se a agarose por fitas de acetato de celulose como suporte, o que permitiu o emprego de menor quantidade de reagentes, maior facilidade de execução e maior rapidez.

MATERIAL E MÉTODO

Em 846 amostras de L.C.R. recebidas do Hospital "Emílio Ribas" para exame bacteriológico foi executada a E.F.C. com o fito de comparar os resultados entre os dois métodos. Na E.F.C. só foi usado o soro do grupo sorológico C por ser aquele que corresponde no momento à quase totalidade dos casos clínicos.

Exame bacteriológico

Em todos os casos foi feito o exame bacterioscópico do L.C.R. em material corado pelo método de Gram. Sempre que possível, o líquido obtido pela punção foi inoculado em tubos contendo os seguintes meios de cultura: ágar-sangue, ágar-chocolate e ágar-triptose. Os tubos semeados foram colocados em atmosfera de CO₂ a 37°C (método da vela).

Anti-soro

Foi obtido em coelho mediante inoculação de *N. meningitidis* do grupo C*. Suspensão do microrganismo em salina for-

molada a 0,4% na concentração de 3 x 10⁸; injeções endovenosas em volumes de 0,1 ml, 0,2 ml, 0,4 ml e 0,8 ml respectivamente, nos 1.º, 3.º, 5.º e 7.º dias sucessivos. Sangria de prova no 12.º dia; no 13.º dia, dose de reforço de 1 ml com sangria total após 5 dias.

A padronização do soro foi feita utilizando-se polissacarídeos da vacina anti-meningocócica do grupo C**. Foram considerados satisfatórios aqueles soros que deram reações positivas quando o teor de polissacarídeos na solução conhecida era da ordem de 0,125 µg/ml.

Imunoelektroforese cruzada

Foi realizada sobre fita de acetato de celulose*** (10 x 17 cm), utilizando-se tampão de barbital, 0,05 U, pH 8,6 (ácido dietilbarbitúrico — 1,705 g/l; dietilbarbiturato de sódio — 9,475 g/l).

Sobre suporte, próximo ao polo negativo, são colocados 10 µl do antígeno e 10 µl de cada amostra do líquido. Paralelamente, com 1 cm de distância, ao lado do polo positivo, são colocados 10 µl de anti-soro de coelho específico para meningococo do grupo C. Cada fita permite a execução de 64 reações.

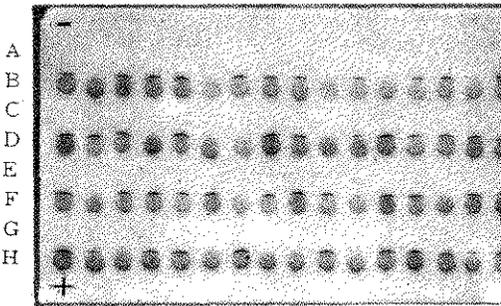
Segue-se corrida eletroforética a 200 V durante 4 min. A seguir procede-se à lavagem de fita em salina 0,85% durante 10 min., sempre com agitação e trocando cinco vezes a solução salina. Depois da lavagem, cora-se com negro de amido (1 g de amido 10 B, 100 ml de ácido acético glacial, 700 ml de metanol e 200 ml de água destilada) e, em seguida, descora-se com solução decolorante (475 ml de metanol, 475 ml de água destilada, 50 ml de ácido acético). Quando existir no L.C.R. em exame uma quantidade de polissacarídeo equivalente ou maior do que aquela que o soro anti-meningocócico é capaz de evidenciar, aparecerá uma linha de precipitação decorrente da reação antígeno-anticorpo.

Os aspectos da fita de eletroforese cruzada é mostrado na figura da página seguinte:

* Amostra C-1054, proveniente do Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, E.U.A.

** Produzida por Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, West Point, Pa., E.U.A.

*** Cellogel.



Linhas A, C, E e G — amostras de L.C.R.
Linhas B, D, F e H — anti-soro

RESULTADOS

Das 846 amostras examinadas, verificamos:

- 248 foram positivas, em cultura, para *Neisseria meningitidis* do grupo C;
- 98 foram positivas, em cultura, para outros germes;
- 30 foram positivas, em cultura, para outras *N. meningitidis* que não do grupo C.

Cotejando os resultados positivos pela E.F.C. com os dos casos comprovados por

cultura (tabela 1), verificamos que houve concordância em 206 amostras, ou seja em 83,06% dos casos, deixando a reação de acusar a presença dos polissacarídeos no líquido em 42 amostras (16,94%).

TABELA 1

Relação entre exames bacteriológicos e imunoelctroforese cruzada para *Neisseria meningitidis* do grupo C

Imunoelctroforese cruzada \ Cultura	Positiva
	Positiva
Negativa	42
Total	248

Nos casos em que outros germes foram os responsáveis pela inflamação meníngea, em número de 98 amostras, somente em uma foi verificada linha de precipitação na E.F.C., mostrando ótima concordância entre os dois métodos, isto é, cerca de 99% (tabela 2).

TABELA 2

Verificação de reação cruzada em 98 amostras positivas para meningites de outras etiologias

Imunoelctroforese cruzada \ Cultura	Cocos Gram-positivos	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	Bacilos Gram-negativos	Total
	Positiva	—	0	1	0	0
Negativa	6	7	41	21	22	97
Total	6	7	42	21	22	98

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 imunoelectroforese cruzada em acetato de celulose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33: 85-89, 1973.

TABELA 3

Relação entre E.F.C. para polissacarídeo "C" e cultura positiva para *N. meningitidis* não identificada como do grupo C

Imunoelectroforese cruzada	Cultura de <i>N. meningitidis</i>					Total
	Grupo B	Rugosa	Não aglutinante	Auto aglutinante	Não identificada	
Positiva	2	6	3	5	1	17
Negativa	2	4	2	2	3	13
Total	4	10	5	7	4	30

Em 30 casos em que foram encontradas neissérias que não puderam ser classificadas como pertencendo ao grupo C, como mostra a tabela 3, a E.F.C. foi positiva em 17, ocorrendo aqui 2 amostras de *N. meningitidis* do grupo B.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados mostram ser a técnica de E.F.C. em acetato de celulose um método rápido e razoavelmente sensível, que pode ser utilizado como meio de diagnóstico da infecção meningocócica. Apesar de pouco se conhecer a respeito do tempo de aparecimento do polissacarídeo, bem como sobre sua permanência no L.C.R., é de se supor que no início da infecção e nos casos tratados logo de início seu teor seja muito baixo, tornando difícil sua evidênciação mesmo com soros muito potentes. Como não há dados que permitam julgar se qualquer

dessas causas influíu nesses resultados, à vista da concordância de 83,06%, pode-se considerar o método satisfatório como auxiliar de diagnóstico.

De 98 casos em que a bactéria isolada não foi o meningococo, apenas um caso foi positivo pela E.F.C., o que demonstra a especificidade do método empregado.

No momento atual, em que se verifica um surto epidêmico de meningite meningocócica em todo o país, este método foi utilizado para o diagnóstico de casos cujo exame bacteriológico seria impossível devido ao intervalo de tempo entre a colheita e a chegada do material ao laboratório. Os resultados fornecidos pela E.F.C. foram plenamente confirmados pelos métodos usuais de diagnóstico, tendo possibilitado diagnosticar com precisão uma epidemia por meningococo C em Rio Branco (Estado do Acre), antes que esta fosse identificada pelos métodos bacteriológicos.

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 imunoelektroforese cruzada em acetato de celulose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33: 85-89, 1973.

RIAL-A/389

PALHARES, M.; GELLI, D.S.; ALMEIDA, M.C.R.; MELLIS, C.E.A.; TAKEDA, A.K. & TAUNAY, A.E. — Detection of polysaccharides of *Neisseria meningitidis* serogroup C in spinal fluid by counter-immunoelectrophoresis in cellulose acetate. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33: 85-89, 1973.

SUMMARY: Bacteriological tests of 846 cerebrospinal fluids from patients suspected of bacterial meningitis were compared with those of counter-immunoelectrophoresis in cellulose acetate. There was an agreement of 83.06% when group C *Neisseria meningitidis* had been isolated, while in meningitis with other bacterial etiology was 99%, which shows the counter-immunoelectrophoresis reaction to be specific.

DESCRIPTORS: counter-immunoelectrophoresis; *Neisseria meningitidis*, serogroup C; meningitis, meningococci; polysaccharides, bacterial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COONROD, J.D. & RYTEL, M.W. — Determination of aetiology of bacterial meningitis by counter-immunoelectrophoresis. *Lancet*, 1: 1154-7, 1972.
2. EDWARDS, E.A. — Immunologic investigations of meningococcal disease. I. Group-specific *Neisseria meningitidis* antigens presented in the serum of patients with fulminant meningococemia. *J. Immunol.*, 106: 314-17, 1971.
3. GREENWOOD, B.M.; WHITTLE, H.C. & DOMINIC-RAJKOVIC, O. — Counter-current immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *Lancet*, 2: 519-21, 1971.
4. HOFFMAN, T.A. & EDWARDS, E.A. — Group-specific polysaccharide antigen and humoral antibody response in disease due to *Neisseria meningitidis*. *J. infect. Dis.*, 126: 636-44, 1972.
5. MAEGRAITH, B.G. — The rapid diagnosis of cerebrospinal fever. *Lancet*, 1: 545-6, 1935.
6. RAKE, G. — Studies on meningococcus infection. V. The presence of meningococcus precipitinogens in the cerebrospinal fluid. *J. exp. Med.*, 58: 375-83, 1933.

Recebido para publicação em 6 de agosto de 1973.