

IMUNOELETROFORESE CRUZADA NO DIAGNÓSTICO DA MENINGITE POR *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*, TIPO b*

Augusta Kiyomi TAKEDA **
Lília Fujimura UMEKITA **
Nereide Borges BOSCARDIN **
Carmo Elias Andrade MELLEES **
Augusto de Escragnolle TAUNAY **

RIALA6/488

TAKEDA, A. K.; UMEKITA, L. F.; BOSCARDIN, N. B.; MELLEES, C. E. A. & TAUNAY, A. E. — Imunoelctroforese cruzada no diagnóstico da meningite por *Haemophilus influenzae*, tipo b. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(2):165-169, 1979.

RESUMO: Foram examinadas 2123 amostras de líquido cefalorraquidiano de doentes de diferentes faixas etárias com suspeita clínica de meningite infecciosa. A metodologia empregada foi a usual para bactérias. Paralelamente foi feita a pesquisa de antígeno específico para *Haemophilus influenzae*, tipo b, no líquido cefalorraquidiano, através da imunoelctroforese cruzada. A atividade do soro utilizado na imunoelctroforese cruzada foi previamente determinada frente a diferentes concentrações do antígeno polissacarídico de *H. influenzae*, tipo b, revelando-se capaz de reagir até a concentração 0,01 µg/ml, o que demonstra a alta sensibilidade da reação. Comparando os resultados do exame bacteriológico e os da imunoelctroforese cruzada e aplicando o teste de Mac Nemar para a amostra dependente, foi verificado que a imunoelctroforese cruzada foi muito mais sensível que a cultura. A positividade na cultura foi de 38%, enquanto que, na imunoelctroforese cruzada, foi de 97%. Levando-se em conta que a quase totalidade dos casos ocorridos na Grande São Paulo são encaminhados para o Hospital "Emílio Ribas"; pode-se considerar que, em São Paulo, o *H. influenzae*, tipo b, é um dos agentes mais freqüentes entre meningites bacterianas, principalmente nos primeiros 12 meses de vida, cujo coeficiente por 100.000 habitantes foi igual a 47,29 para o período de outubro de 1976 até agosto de 1977.

DESCRITORES: meningite por *Haemophilus*, diagnóstico; imunoelctroforese cruzada na detecção do antígeno para *Haemophilus influenzae*, tipo b.

INTRODUÇÃO

O *Haemophilus influenzae*, tipo b, pode ser considerado um dos agentes mais freqüentes das meningites bacterianas, principalmente se considerarmos a ocorrência nos 12 primeiros meses de vida. A partir dessa idade, decresce a incidência para aumentar novamente nos grupos etários mais avançados.

Entre todos os tipos de *H. influenzae*, somente o tipo b tem predileção pela localização meningéana. Em São Paulo, trabalho

publicado por LIMA⁴ em 1932, comprova ser o *H. influenzae*, tipo b, um dos agentes mais importantes da meningite bacteriana e, recentemente, o mesmo fato foi novamente comprovado por BASTOS *et alii*^{1, 2}.

Nos Estados Unidos, de acordo com os dados de FRASER³, MICHALS⁵, PARKE JR.⁷ e SMITH JR.⁸, a incidência de meningite por *H. influenzae*, tipo b, tem aumentado nos últimos anos.

Os dados relativos à freqüência desta infecção são muitas vezes deficientes, devido à

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

** Da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz.

dificuldade de estes germes se desenvolverem em meios de cultura, quando não são usadas condições especiais para o seu crescimento.

Em vista de tal dificuldade, foi utilizada a pesquisa direta dos antígenos de *H. influenzae*, tipo b, no líquido cefalorraquidiano (L.C.), através da imunoelctroforese cruzada, como meio diagnóstico, para avaliar a incidência deste agente infeccioso. Outrossim, foi efetuado o estudo comparativo dos dados, assim obtidos, com aqueles proporcionados pelo método bacteriológico.

MATERIAL E MÉTODOS

2.123 amostras de líquido cefalorraquidiano (L.C.) de pacientes internados no Hospital Emílio Ribas com suspeita de meningite, no período de outubro de 1976 a agosto de 1977, foram submetidos às provas laboratoriais que consistiram em:

a) exames bacteriológicos que constaram de bacterioscopia do L.C., pelo método de Gram, e cultura do mesmo em meios adequados a saber: ágar-sangue e ágar-chocolate, base Mueller-Hinton, em atmosfera de 10% de CO² e umidade;

b) pesquisa direta de antígeno polissacarídico no L.C., efetuada através da reação de imunoelctroforese cruzada, utilizando soro específico anti-*H. influenzae*, tipo b*.

A reação de imunoelctroforese cruzada (I.C.) foi realizada em fitas de acetato de celulose*.

A sensibilidade desta reação foi previamente determinada, testando-se diferentes concentrações de polissacarídeo purificado de *H. influenzae*, tipo b, frente ao soro específico, havendo positividade da reação até a concentração de 0,01 µg/ml do antígeno polissacarídico.

RESULTADOS

Nas 2.123 amostras de L.C. com suspeita clínica de meningite infecciosa, o agente etiológico causal foi *H. influenzae* em 223 dos casos, sendo que em 85 destas amostras foi isolado o *H. influenzae*, e em 216, identificadas as frações antigênicas desta bactéria. Relacionados os 2 métodos, houve concordância positiva em 78 casos ou seja em 35%, sendo que somente a I.C. foi positiva em 138 ou seja 62%, e somente a cultura em apenas 7 casos, ou seja 3%.

Aplicando o teste de Mac Nemar para amostra dependente, pode-se concluir que há uma diferença significativa nas duas reações.

A possível existência de reação cruzada na I.C. é mostrada na tabela 2 onde, em 418 L.C. nos quais foram isoladas outras bactérias, somente ocorreu reação cruzada com *S. pneumoniae* (5 vezes), *Proteus* sp. (1 vez) e *Klebsiella* sp. (1 vez); nos demais, não foi encontrada nenhuma reação cruzada, comprovando-se assim a especificidade da reação. Nesta mesma amostra, 1900 L.C. foram negativos para ambas as reações, o que corresponde a 99,63% de concordância.

Comparando o total de casos detectados desde outubro de 1976 a agosto de 1977 (223 casos) com o total dos anos anteriores, verificamos um aumento, que se deve à maior eficácia da I.C., quando comparada à cultura que, se considerada, detectaria somente 85 casos, não diferindo das frequências anteriormente observadas.

Em relação à idade, a frequência na faixa etária de até 12 meses corresponde a 60,3%, e a 78,1% até 24 meses.

O coeficiente de incidência por 100.000 habitantes (tab. 4) mostrou maior prevalência para o grupo etário menor que 1 ano de idade, correspondendo a 47,29 para o período de outubro de 1976 a agosto de 1977, na região da Grande São Paulo.

TABELA 1

Comparação entre imunoelctroforese cruzada e cultura para *Haemophilus influenzae*, tipo b, em amostras de líquido cefalorraquidiano

Imunoelctroforese cruzada	Amostras positivas	Amostras negativas	Total
Cultura			
Amostras positivas	78	7	85
Amostras negativas	138	1900	2038
Total	216	1907	2123

$$X^2 = 118,35 - P < 5\%$$

* Anti-serum burro 132, lot 4, gentilmente cedido pelo Dr. John B. Robbins, Diretor da Divisão de Produtos Bacteriológicos da Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland, EUA.

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):165-169.

TABELA 2

Ocorrência da reação de imunoeletroforese cruzada para *Haemophilus influenzae*, tipo b, em presença de outros agentes etiológicos isolados no liquor

Imunoeletroforese cruzada Cultura	Amostras positivas	Amostras negativas	Total
<i>Pneumococcus</i>	5	92	97
<i>Salmonella</i>	—	49	49
<i>Proteus</i>	1	5	6
<i>Escherichia coli</i>	—	7	7
<i>Citrobacter</i>	—	1	1
<i>Klebsiella</i>	1	8	9
<i>Pseudomonas</i>	—	3	3
<i>Streptococcus</i>	—	11	11
<i>Staphilococcus aureus</i>	—	6	6
<i>Enterobacter</i>	—	10	10
<i>Listeria</i>	—	3	3
<i>Staphilococcus</i>	—	7	7
<i>N. meningitidis</i> NT	—	1	1
<i>N. meningitidis</i> A	—	148	148
<i>N. meningitidis</i> C	—	60	60
Total	7	411	418

TABELA 3

Frequência de casos de meningite por *Haemophilus influenzae*, tipo b, segundo a faixa etária, na Grande São Paulo no período de 1976 a 1977

Faixa etária (anos)	Ano					Outubro de 1976 a Agosto de 1977**
	1971*	1972*	1973*	1974*	1975*	
0 — 1	40	39	32	17	28	120
1 — 4	22	31	26	11	33	57
5 — 9	1	4	4	3	1	11
10 — 14	—	2	2	—	—	
15 — 19	—	—	—	—	—	
20 — 29	—	—	—	2	2	8
30 — 39	—	—	1	—	—	
40 — 49	—	—	1	—	—	3
acima de 50	—	—	—	—	2	
ignorada	1	1	1	—	—	24
Total	63	81	67	33	66	223

Fontes

* Centro de Informações de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, SP.

** O presente trabalho.

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):165-169.

TABELA 4

Casos e coeficiente de *Haemophilus influenzae*, tipo b, por 100.000 habitantes por faixa etária na Grande São Paulo

Idade	N.º casos	Porcentagem	Coeficiente*
0 — 1	120	61	47,29
1 — 2	34	18	6,54
3 — 4	23	11	4,08
5 — 14	11	5	0,42
15 — 24	6	3	0,27
25 — 39	2	1	0,08
acima de 40	3	1	0,12
ignorada	24	—	—
Total	223	—	—

* Cálculo do coeficiente de incidência por 100.000 habitantes para o período de outubro de 1976 a agosto de 1977, tendo como período médio 15 de março de 1977.

DISCUSSÃO

A maior positividade da imunoeletroforese cruzada, quando comparada à cultura, poderá ser explicada pelo fato de a I.C. não exigir germes vivos e íntegros, bastando apenas a existência de resíduos antigênicos da bactéria. Por outro lado, a possibilidade de a amostra (L.C.) ser enviada para localidades distantes, sem maiores cuidados de coleta e preservação, e a não interferência de antibióticos na amostra, torna o método mais prático e eficiente.

As reações cruzadas, observadas na tabela 2 com as bactérias capsuladas, provavelmente se devem a alguns determinantes antigênicos comuns de origem polissacarídica. Pode ainda ser aventada a hipótese de ter ocorrido uma contaminação por bactérias dos gêneros *Proteus* e *Klebsiela*.

Os resultados analisados na tabela 3, quanto à frequência anual de casos por *H. influenzae*, tipo b, são subestimados, uma vez que nem todos os casos foram internados no Hospital Emílio Ribas.

O número elevado de casos no período considerado se deve principalmente à técnica utilizada pois, se considerarmos somente a cultura, não estaria muito acima do número de casos verificados nos anos anteriores.

Pelo fato de a amostragem considerada representar a quase totalidade dos casos ocorridos na Grande São Paulo, podemos admitir que o *H. influenzae*, tipo b, é um dos agentes mais frequentes das meningites bacterianas, principalmente nos 12 primeiros meses de vida, cujo coeficiente de incidência, por 100.000 habitantes, foi igual a 47,29 no período de outubro de 1976 a agosto de 1977.

CONCLUSÃO

A imunoeletroforese cruzada para *Haemophilus influenzae*, tipo b, quando comparada com a cultura, mostrou ser de maior sensibilidade, apresentando ainda uma maior facilidade e rapidez na execução. A presença de antibióticos não interferiu no resultado da reação, conduzindo a um diagnóstico mais preciso e rápido, mesmo quando o L. C. não tinha sido colhido e mantido em condições ideais para os exames usuais de laboratório, possibilitando ainda a sua remessa para localidades distantes, sem maiores cuidados de preservação.

A eficácia desta técnica e a importância de sua utilização em laboratórios de Saúde Pública é facilmente verificada na tabela 3, quando comparamos a frequência de casos diagnosticados de *H. influenzae*, tipo b, em crianças menores que 1 ano, no período de 1971 a 1975, com a encontrada a partir de 1976, quando de sua introdução.

Este aumento somente pode ser explicado pelo aprimoramento técnico, uma vez que esta doença não costuma apresentar características epidêmicas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. José Cássio de Moraes, Diretor do Centro de Informações de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, SP, pela orientação na computação de dados.

RIALA6/488

TAKEDA, A. K.; UMEKITA, L. F.; BOSCARDIN, N. B.; MELLES, C. E. A. & TAUNAY, A. E. — Counter-immunoelectrophoresis in the diagnosis of *Haemophilus influenzae*, type b, meningitis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(2):165-169, 1979.

SUMMARY: A total of 2123 specimens of spinal fluid were collected from patients admitted to Hospital "Emílio Ribas" under the suspicion of infectious meningitis who belonged to various age groups. The standard bacteriological examination and the search (by counter-immunoelectrophoresis) for the specific antigen of *Haemophilus influenzae* type b were made in each specimen. Previous determination of the serum activity was made against various concentrations of the polysaccharide antigen of *H. influenzae* type b. Concentrations of up to 0.01 μ g/ml were measured and this showed the high sensitivity of counter-immunoelectrophoresis. The results of the bacteriological examination and of counter-immunoelectrophoresis were compared using Mac Nemar statistical test for dependent samples. The counter-immunoelectrophoresis was much more sensitive than isolation and identification of bacteria since the former procedure yielded 97% of positive results while the latter gave 38%. Since almost all meningitis cases in the Greater São Paulo are admitted to "Emílio Ribas" Hospital, it may be inferred that the *H. influenzae* type b is one of the most frequent agents of bacterial meningitis in São Paulo, specially in children less than one year old. According to the present findings, the coefficient of incidence of bacterial meningitis for 100,000 inhabitants was 47,29% for the period from October 1976 to August 1977.

DESCRIPTORS: meningitis, *Haemophilus*, diagnosis; counter-immunoelectrophoresis for detection of *Haemophilus influenzae*, type b, antigen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BASTOS, C. O.; TAUNAY, A. E.; TIRIBA, A. C. & GALVÃO, P. A. A. — Meningites meningocócicas em São Paulo. *Boln Of. sanit. pan-am.*, 79:54-62, 1975.
2. BASTOS, C. O.; TAUNAY, A. E.; GALVÃO, P. A. A.; TIRIBA, A. C.; SARAIVA, P. A.; CASTRO, I. O. & LOMAR, A. V. — Meningites: considerações gerais sobre 15.067 casos internados no Hospital "Emílio Ribas" durante o quinquênio 1958-1972. Ocorrência, etiologia e letalidade. *Rev. Assoc. méd. bras.*, 19:451-6, 1973.
3. FRASER, D. W.; DARBY, C. P.; KOHELER, R. E.; JACOBS, C. F. & FEDMAN, R. A. — Risk factors in bacterial meningitis: Charleston County, South Carolina. *J. infect. Dis.*, 127:271-7, 1973.
4. LIMA, C. — Meningites bacterianas em São Paulo. *Anais paul. Med. Cirurg.*, 24:145-9, 1932.
5. MICHAELS, R. H. — Increase in influenzal meningitis. *New Engl. J. Med.*, 285:666-7, 1971.
6. PALLARES, 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*, 33:85-9, 1973.
7. PARKE JR., J. C.; SCHNEERSON, R. & ROBBINS, J. B. — The attack rate, age incidence, racial distribution, and case fatality rate of *Hemophilus influenzae* type b meningitis in Mecklenburg county, North Carolina. *J. Pediat.*, 81:765-9, 1972.
8. SMITH JR., E. W.; HAYNES, R. E. — Changing incidence of *Hemophilus influenzae* meningitis. *Pediatrics*, 50:723-7, 1972.

Recebido para publicação em 4 de abril de 1979.

