

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Doenças Infecciosas e Parasitárias

DIAGNÓSTICO DE CASOS SUSPEITOS DE DOENÇA
MENINGOCÓCICA POR MEIO DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM
CADEIA

LUCIANA GOMES FRANCISCO PEDRO

Rio de Janeiro

2008



DIAGNÓSTICO DE CASOS SUSPEITOS DE DOENÇA MENINGOCÓCICA POR MEIO DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA

Luciana Gomes Francisco Pedro

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Orientadores: Dr. David Eduardo Barroso
Prof. Dr. Ricardo Pereira Igreja

Rio de Janeiro
Dezembro/2008

Pedro, Luciana Gomes Francisco

Diagnóstico de casos suspeitos de doença meningocócica por meio da reação da polimerase em cadeia / Luciana Gomes Francisco Pedro. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2008. xiii, 150 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: David Eduardo Barroso e Ricardo Pereira Igreja
Dissertação (Mestrado) – UFRJ, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina – Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2008.

Referências Bibliográficas: f. 125-148

1. *Neisseria meningitidis*. 2. Reação da polimerase em cadeia. 3. Petéquias e púrpura. 4. Doença meningocócica. 5. Doenças Infecciosas e Parasitárias – Tese. I. Barroso, David Eduardo. II. Igreja, Ricardo Pereira. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina – Doenças Infecciosas e Parasitárias. IV. Título.

DIAGNÓSTICO DE CASOS SUSPEITOS DE DOENÇA
MENINGOCÓCICA POR MEIO DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM
CADEIA

Luciana Gomes Francisco Pedro

Orientadores: Dr. David Eduardo Barroso
Prof. Dr. Ricardo Pereira Igreja

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Aprovada por:

Presidente, Prof^a. Dr^a. Beatriz Meurer Moreira

Prof^a. Dr^a. Diana Maul de Carvalho

Prof. Dr. Nelson Gonçalves Pereira

Rio de Janeiro
Dezembro/2008

Dedico este trabalho a São Sebastião – santo guerreiro, protetor da humanidade contra a peste, a fome e a guerra - que deu origem ao nome do mais importante hospital de infectologia do Estado do Rio de Janeiro.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Augusto e Vera Regina, por terem me preparado tão cuidadosamente para a vida.

Aos meus irmãos Andréa e Marcelo, pela minha infância feliz.

Ao meu marido Bruno Lobo Brandão, pelo apoio incondicional, amor e cumplicidade.

Aos meus sobrinhos Guilherme e Maria Eduarda, pelos momentos de descontração e alegria.

Ao meu orientador Dr. David Barroso, pela supervisão cuidadosa e pela amizade.

À Professora Terezinha Marta P. P. Castiñheiras, pelo exemplo profissional e pessoal.

À amiga Luciana Gonçalves Lauria Novais, por ter me mostrado o lado colorido de um mundo preto e branco.

À amiga Mari Tuyama, pela sua enorme amizade.

Aos meus amigos de residência, Márcio Fernandes e Juliana Matos, pelos bons momentos.

À todos que contribuíram para a minha formação como médica, em especial às Dras. Káris Maria de Pinho Rodrigues, Regina Barbosa Moreira e Denise Vigo Postch, do serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HUCFF.

Ao Professor Ricardo Pereira Igreja, pela paciência e disponibilidade.

À Tia Josélia, professora da 4ª série primária da Escola São Vicente de Paulo - Petrópolis, de quem nunca esquecerei.

Aos meus amigos de plantão do IEISS, os médicos Clarisse Bressan e Vinícius Menezes, por tudo que aprendi naquele hospital.

À Farmacêutica Maria Cristina Rebelo, pelo apoio a assuntos relacionados ao laboratório do IEISS.

Ao Rafael Saraiva, pela colaboração na edição das figuras desta dissertação.

À Dra. Andréa Gina Varon, pela gentileza de ter cedido uma das fotos

utilizadas neste trabalho.

Às Sras. Maria Claudia Santiago e Leila Gonçalves Lauria Novais, funcionárias do COMUT da Biblioteca de Manguinhos – Fiocruz, pela grande agilidade e eficiência no trabalho que executam.

Ao Dr. Ronaldo Tourinho Saraiva - ex-diretor do IEISS, pela dedicação ao Instituto e pelo apoio necessário para a realização deste estudo.

À Gerência de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, na pessoa da Dra. Cecília Nicolai, pela disponibilização dos dados epidemiológicos da cidade do Rio de Janeiro.

À Assessoria de Meningites da Secretaria de Estado da Saúde do Rio de Janeiro, na pessoa da Dra. Maria de Fátima Calderaro, Dra. Andreia Aires e Dra. Regilma Alves de Oliveira, pela disponibilização de dados epidemiológicos do Estado do Rio de Janeiro.

Ao Professor Fernando S. V. Martins, com quem aprendi - entre muitas coisas - que nem sempre o que vem primeiro é o mais importante.

“Acute meningococemia can strike with frightening rapidity – a patient may be well at breakfast time but dead by the same afternoon”.

**Greenwood BM, Meningococcal disease,
Hunter's Tropical Medicine, 1991.**

RESUMO

DIAGNÓSTICO DE CASOS SUSPEITOS DE DOENÇA MENINGOCÓCICA POR MEIO DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA

Luciana Gomes Francisco Pedro

Orientadores: Dr. David Eduardo Barroso
Prof. Dr. Ricardo Pereira Igreja

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Febre e exantema hemorrágico estão fortemente associados à doença meningocócica no Rio de Janeiro. A utilização precoce de antibiótico está indicada nos casos suspeitos de doença meningocócica e conseqüentemente é esperada uma redução dos casos confirmados por cultura, bacterioscopia e teste de aglutinação pelo látex. Nós avaliamos um ensaio de multiplex PCR para identificação de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* em amostras biológicas de casos de meningite com exantema hemorrágico não confirmados pelos métodos de laboratório tradicionais. Para detecção do DNA bacteriano no LCE (n = 71) ou no sangue (n = 5), foi utilizado um ensaio de multiplex PCR de triagem desenhado para a amplificação dos genes conservados *crgA*, *ply* e *bexA*, respectivamente. Do total dos casos estudados, 70 amostras de LCE e 3 amostras de sangue (96%) foram positivas pelo método de PCR para *N. meningitidis*. Outro ensaio de PCR foi capaz de identificar o sorogrupo de *N. meningitidis* em 82% das amostras positivas – sorogrupo A (2%), B (60%), C (7%), X (3%), Y (2%), ou W₁₃₅ (24%). Em casos de meningite bacteriana não especificados, a técnica de PCR se mostrou um instrumento adjuvante valioso na confirmação da etiologia meningocócica.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*; Reação da polimerase em cadeia; Petéquia e púrpura; Doença meningocócica; Doenças Infecciosas e Parasitárias

Rio de Janeiro
Dezembro/2008

ABSTRACT

DIAGNOSIS OF SUSPECTED CASES OF MENINGOCOCCAL DISEASE BY USE OF POLIMERASE CHAIN REACTION

Luciana Gomes Francisco Pedro

Orientadores: Dr. David Eduardo Barroso
Prof. Dr. Ricardo Pereira Igreja

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Fever and a petechial rash are strongly associated with meningococcal disease in the city of Rio de Janeiro. Early antibiotic therapy is indicated and consequently, a reduction of confirmed cases by culture, Gram stain, and latex agglutination test is expected. We evaluated a multiplex PCR assay to identify *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in biological samples from cases of non-culture proven meningitis with a petechial rash at presentation. To detect DNA in cerebrospinal fluid (n = 71) or blood (n = 5), was performed a PCR screen, based on the *crgA*, *ply* and *bexA* targets, respectively. Of the total, 70 CSF and 3 blood samples (96%) were positive by PCR for the presence of *N. meningitidis* DNA. Another PCR assay predicted in 82% of these samples *N. meningitidis* serogroups A (2%), B (60%), C (7%), X (3%), Y (2%), 29E (2%) or W₁₃₅ (24%). In non-culture proven meningitis, PCR was found to be a valuable adjunct for the demonstration of meningococcal etiology.

Key-words: *Neisseria meningitidis*; Polimerase chain reaction; non-blanching rash; meningococcal disease; Infectious and Parasitic Diseases

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE ILUSTRAÇÕES, DE QUADROS E DE TABELAS.....	XI
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1 Vigilância epidemiológica das doenças infecciosas	9
2.2 Doença Meningocócica	14
2.2.1 <i>Epidemiologia</i>	14
2.2.2 <i>Fisiopatogenia</i>	31
2.2.3 <i>Diagnóstico clínico</i>	43
2.2.4 <i>Diagnóstico diferencial</i>	52
2.2.4.1 Meningites agudas	55
2.2.4.2 Septicemia bacteriana de outras etiologias.....	62
2.2.4.3 Dengue.....	65
2.2.4.4 Febre maculosa brasileira	69
2.2.4.5 Causas pouco freqüentes de exantema hemorrágico	72
2.2.4.6 Causas não infecciosas	76
2.2.5 <i>Diagnóstico laboratorial</i>	76
2.2.6 <i>Tratamento</i>	86
2.2.7 <i>Prevenção</i>	88
3 OBJETIVOS.....	92
3.1 Objetivo geral	92
3.2 Objetivos específicos	92
4 METODOLOGIA	93
4.1 Desenho, local e população do estudo.....	93
4.2 Definição de caso.....	96
4.3 Critério de exclusão.....	97
4.4 Ensaio da reação da polimerase em cadeia (PCR)	97
4.5 Banco de dados	100
4.6 Considerações éticas	100
5 RESULTADOS.....	101
6 DISCUSSÃO	106
7 CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXOS.....	149
Anexo 1 Ficha de coleta de dados – Projeto PCR	149
Anexo 2 Artigo publicado	150

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	Coleção Estadunidense de Culturas Padrão (do inglês <i>American Type Culture Collection</i>)
ATFB	Febre Africana por picada de carrapato (do inglês de <i>African tick-bite fever</i>)
CDC	Centros para Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CID	classificação internacional de doenças
CRIE	Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais
DGN	diplococos Gram negativo
ET	tipos eletroforéticos (do inglês <i>electrophoretic types</i>)
FPB	proteínas reguladoras ou captadoras de ferro (do inglês <i>ferric iron-binding protein</i>)
GMPS	Escala de prognóstico de Glasgow para septicemia meningocócica (do inglês de Glasgow Meningococcal Septicaemia Prognostic Score)
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
HIV	vírus da imunodeficiência humana (do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>)
HLA	antígenos leucocitários humanos
HPeV	parechovírus humanos
IEISS	Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
LCE	Líquido cérebro-espinhal
LOS	lipooligossacarídeos
MBA	meningite bacteriana aguda
MBL	via lecitina fixadora de manose (do inglês <i>mannose-binding lectin</i>)
MLEE	eletroforese de multilocus enzimático (do inglês <i>multilocus enzyme electrophoresis</i>)
MLST	tipagem por seqüenciamento de multilocus (do inglês <i>multilocus sequence typing</i>)
MRSA-CA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina de origem comunitária
OMS	Organização Mundial da Saúde
Op	proteínas associativas de opacidade (do inglês <i>opacity proteins</i>)
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	reação de polimerase em cadeia (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
RT-PCR	reação da polimerase em cadeia em tempo real
SES RJ	Secretaria de Estado da Saúde do Rio de Janeiro
SNC	sistema nervoso central
ST	tipos seqüenciados (do inglês <i>sequence types</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF	fator de necrose tumoral
UE	unidades de endotoxina
UFC	unidades formadoras de colônia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, DE QUADROS E DE TABELAS

Figura 1	Corte da parede celular de <i>N. meningitidis</i> (adaptado de Stephens <i>et al.</i> , 2007).	21
Figura 2	Distribuição geográfica dos principais sorogrupos de <i>N. meningitidis</i> no mundo e dos surtos causados pelo sorogrupo B por sorotipos (adaptado de Stephens <i>et al.</i> , 2007).	22
Figura 3	Países que constituem o Cinturão da Meningite na África (disponível em: www.cdc.gov).....	24
Figura 4	Esquema da fisiopatogenia da doença meningocócica invasiva (adaptado de Rosentein <i>et al.</i> , 2001).	32
Figura 5	Representação esquemática das proteínas de adesão do meningococo (adaptado de Corbett <i>et al.</i> , 2004). LOS: lipooligossacarídeo; Opa e Opc: proteínas associativas de opacidade.....	34
Figura 6	Diagrama do espectro clínico da infecção por <i>N. meningitidis</i>	37
Figura 7	Evolução temporal da infecção pelo vírus do dengue (adaptado de Halstead, 2007).....	68
Figura 8	Organograma das amostras selecionadas no IEISS, no período de 2004 a 2005.	94
Figura 8	Linha 1: marcador de tamanho molecular (Invitrogen); 2: amplificação por meio do ensaio de PCR multiplex dos genes <i>bexA</i> (343 bp), <i>crgA</i> (230 bp) and <i>ply</i> (80 bp) de cepas padrão Hib ATCC 10211, Nm ATCC 13090 and Sp ATCC 49619, respectivamente; 3-10: amplificação por PCR de regiões específicas do gene <i>ctrA</i> (Z = 667 bp) de isolado clínico e resultados obtidos quando o ensaio foi aplicado às amostras biológicas, mostrando a detecção dos sorogrupos X (525 bp), A (400 bp), B (450 bp), C (250 bp), 29E (667 bp), W ₁₃₅ (120 bp) e Y (120 bp); 11: controle negativo.	102
Figura 10	Organograma dos resultados do método de PCR multiplex aplicado para a detecção dos genes <i>crgA</i> , <i>ply</i> e <i>bexA</i>	103
Figura 11	Organograma dos resultados do método de PCR aplicado para a determinação do genogrupo.	104

Foto 1	Exantema hemorrágico em paciente com meningococemia (ilustração da autora)	40
Foto 2	Exantema máculo-papular em paciente com meningococemia (ilustração da autora).	47
Foto 3	Petéquias e manchas equimóticas múltiplas em paciente com <i>purpura fulminans</i> por <i>N. meningitidis</i> do sorogrupo B. Presença de necrose distal simétrica nos membros superiores (ilustração do Dr. David E. Barroso).....	50
Foto 4	Exantema petequial rapidamente progressivo em paciente com septicemia por <i>C. canimorsus</i> (Band <i>et al.</i> , 2008).....	64
Foto 5	Principais espécies de mosquitos <i>Aedes</i> transmissores de dengue (disponível em: www.inmetro.gov.br)	65
Foto 6	A e B - fêmea ingurgitada de <i>Amblyomma cajennense</i> . (disponível em: www.infobibos.com/Artigos/FebreMaculosa/carrapato.gif ; Marcelo Campos Pereira)	70
Foto 7	Exantema hemorrágico em paciente com riquetsiose (ilustração Dra. Andréa Varon).....	72
Foto 8	Exantema hemorrágico em paciente com riquetsiose (ilustração do Dr. Vinícius Menezes).....	72
Foto 9	Carrapato <i>Hyalomma</i> : vetor do vírus da febre hemorrágica Criméia-Congo (disponível em: www.nano.org.uk).	73
Foto 10	Manifestações cutâneas de paciente iraniana com diagnóstico de febre hemorrágica Criméia-Congo com forma hemorrágica grave (ilustração de Mardini e Keshtkar-Jahromi, 2007).....	74
Foto 11	Escara de inoculação <i>tâche noire</i> (<i>black spot</i>) provocada por <i>Amblyomma hebraeum</i> em paciente com febre africana por picada de carrapato (disponível em: pediatrician-in-swaziland.blogspot.com/2007_04_01_archive.html).....	75
Foto 12	Diplococos Gram negativos (x1000) na posição endoleucocitária observada em esfregaço de LCE (Fonte: Rosentein <i>et al.</i> , 2001).	82

Gráfico 1	Série histórica das principais etiologias de meningite bacteriana aguda no Estado do Rio de Janeiro.	3
Gráfico 2	Série histórica do número total de casos notificados de doença meningocócica no Estado do Rio de Janeiro, além dos subtotais de casos suspeitos (diagnóstico clínico) e casos confirmados (métodos de bacteriologia convencional).....	4
Gráfico 3	Série histórica das taxas de letalidade da doença meningocócica no Estado do Rio de Janeiro.	4
Gráfico 4	Série histórica das taxas de letalidade de casos suspeitos (diagnóstico clínico) e de casos confirmados (métodos de bacteriologia convencional) de doença meningocócica no Estado do Rio de Janeiro.	7
Gráfico 5	Série histórica da distribuição dos diferentes sorogrupos de <i>N. meningitidis</i> no Estado do Rio de Janeiro.	26
Gráfico 6	Série histórica da incidência anual de doença meningocócica na cidade do Rio de Janeiro e das campanhas de vacinação implementadas pelo Ministério da Saúde.....	27
Gráfico 7	Série histórica dos casos e óbitos de meningite viral no Estado do Rio de Janeiro.	59
Gráfico 8	Série histórica de casos de dengue no Rio de Janeiro.	66
Gráfico 9	Série de casos de febre maculosa no Rio de Janeiro, 2004 – 2007.	71
Gráfico 10	Distribuição dos casos estudados por faixa etária e sexo.....	101
Gráfico 11	Distribuição dos sorogrupos de <i>N. meningitidis</i> na população estudada.	104
Tabela 1	Descrição dos principais complexos clonais relacionados à doença meningocócica invasiva e distribuição geográfica	30
Tabela 2	Principais causas não infecciosas de febre e exantema hemorrágico	76
Tabela 3	Seqüência de bases utilizadas como iniciadores na reação de PCR para cada agente bacteriano e os respectivos tamanhos dos produtos amplificados.....	98
Tabela 4	Seqüências de bases utilizadas como iniciadores na reação de PCR para identificação dos sorogrupos de <i>N. meningitidis</i> e os respectivos tamanhos moleculares	99

1 INTRODUÇÃO

Meningite bacteriana aguda é uma doença potencialmente fatal com alta taxa de letalidade e de seqüelas neurológicas permanentes (Hart e Rogers, 1993; Greenwood, 2000). *Neisseria meningitidis* é a principal causa de meningite bacteriana aguda, septicemia de origem comunitária e *purpura fulminans* em diversas regiões, em geral, seguido por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (Riordan *et al.*, 1995; Barroso *et al.*, 2002; Harrison, 2006). A bactéria *N. meningitidis* é ainda reconhecida por sua capacidade de causar casos secundários, surtos e epidemias.

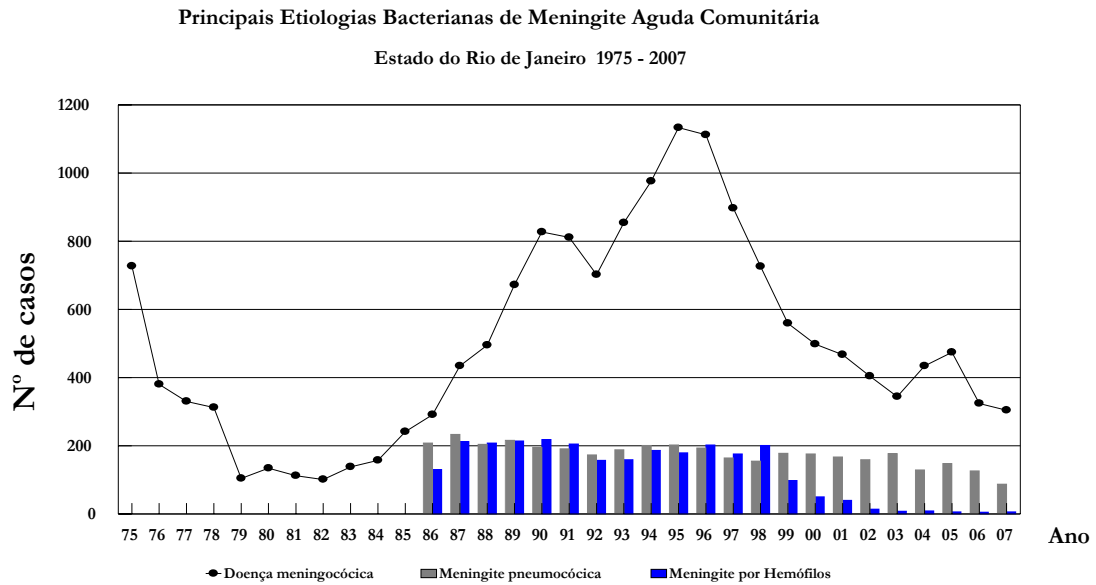
Com o advento das vacinas conjugadas, a epidemiologia das meningites bacterianas vem sofrendo alterações significativas (Finn, 2004; Harrison, 2006). *H. influenzae* tipo b (Hib) que era uma importante causa de meningite bacteriana em crianças, atualmente se tornou um patógeno humano raro. A redução da incidência de doença invasiva por *S. pneumoniae* também vem sendo alcançada mais recentemente em alguns países. Nos Estados Unidos, a incidência de doença pneumocócica invasiva, incluindo a meningite, vem sendo reduzida de forma marcante e sustentada, após a implementação da vacina conjugada heptavalente em alguns Estados (Black *et al.*, 2004). Na Inglaterra, a introdução da vacina antimeningocócica C conjugada no calendário de rotina, em 1999, reduziu em 81% a incidência da doença causada por este sorogrupo (Miller *et al.*, 2001).

No Brasil a doença meningocócica passou a ser de notificação compulsória no início do século XX, porém em algum momento a vigilância desta doença foi interrompida, e somente foi retomada na década de 1970, quando houve a

necessidade da reestruturação da vigilância epidemiológica das meningites. Naquela época, durante a última pandemia pelo sorogrupo A, houve a constatação da ausência de estrutura para o diagnóstico laboratorial em quase todo território nacional. Desde então, *N. meningitidis* sempre foi a principal causa de meningite bacteriana aguda no Brasil, mesmo antes da introdução da vacina conjugada contra Hib. Após a introdução desta vacina no calendário básico infantil, em 1999, houve uma queda de 90% na incidência de casos de meningite por este agente, e *S. pneumoniae* passou a ser a segunda maior causa de meningite bacteriana (Miranzi *et al.*, 2006). Igualmente como ocorreu quando a vacina Hib conjugada foi licenciada nos Estados Unidos da América, em 1990, as vacinas conjugadas contra meningococo do sorogrupo C e sete sorotipos de *S. pneumoniae* somente estão disponíveis no Brasil, a um alto custo, em clínicas de imunização particulares, inacessíveis para a maioria da população.

A doença meningocócica é uma das principais emergências infecciosas e uma séria ameaça para o bem-estar da comunidade. No período de 2000 a 2005, foram notificados ao Ministério da Saúde 23.204 casos; 4.570 (20%) evoluíram para o óbito e o número de pessoas com seqüela neurológica permanente é desconhecido. Esta estimativa tem como base o guia de vigilância de meningites do Ministério da Saúde do Brasil, que inclui o critério clínico – febre associada a exantema hemorrágico em pacientes com meningite ou septicemia, na ausência de confirmação laboratorial por cultura, detecção de antígenos ou bacterioscopia - como casos suspeitos de doença meningocócica (A39.9, ISCD-10). Desse total, 2618 (11%) casos de doença meningocócica foram notificados pelo Estado do Rio de Janeiro (Gráfico 1), porém apenas 28% (731/2618) tiveram a confirmação do diagnóstico através dos métodos laboratoriais correntemente em uso (Gráfico 2); a

letalidade foi de 22% (578/2618) (Gráfico 3). No mesmo período, 934 casos de meningite por *S. pneumoniae* e 125 casos por *H. influenzae* foram notificados nesse Estado (Gráfico 1); com letalidade de 36% e 13%, respectivamente (Secretaria de Estado da Saúde do Rio de Janeiro).



GEDMIR-Meningites/SESDEC/SES-RJ

Gráfico 1 Série histórica das principais etiologias de meningite bacteriana aguda no Estado do Rio de Janeiro.

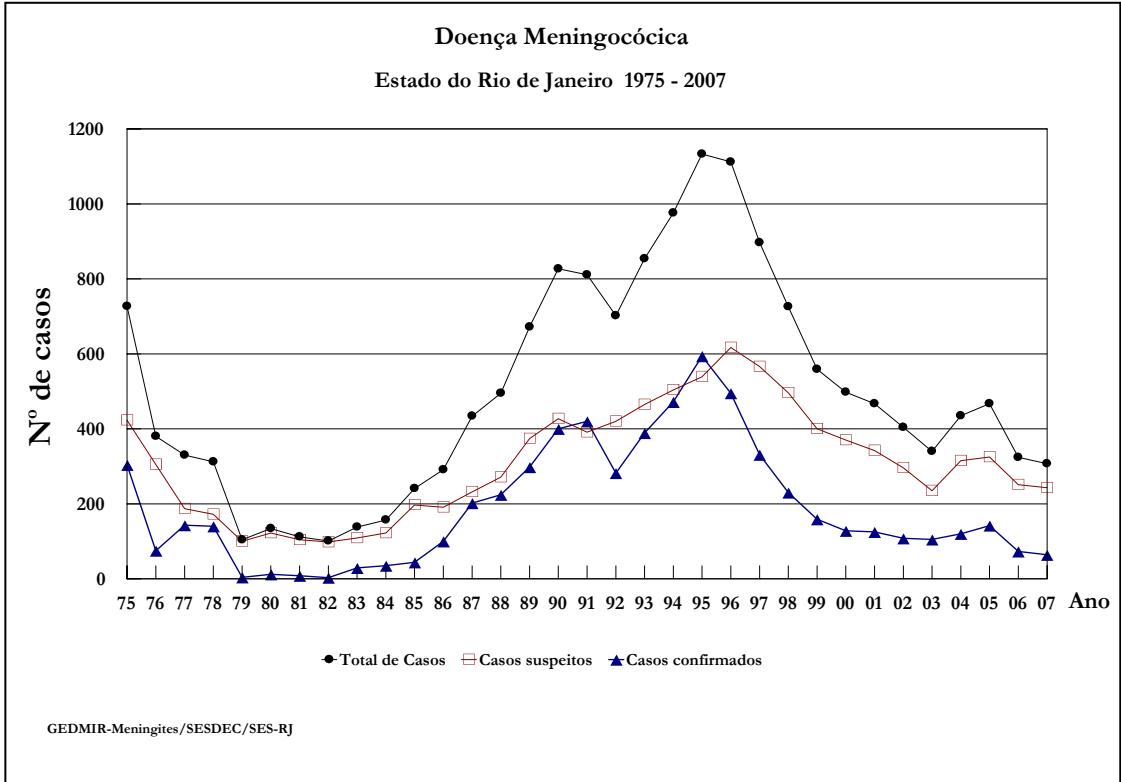


Gráfico 2 Série histórica do número total de casos notificados de doença meningocócica no Estado do Rio de Janeiro, além dos subtotais de casos suspeitos (diagnóstico clínico) e casos confirmados (métodos de bacteriologia convencional).

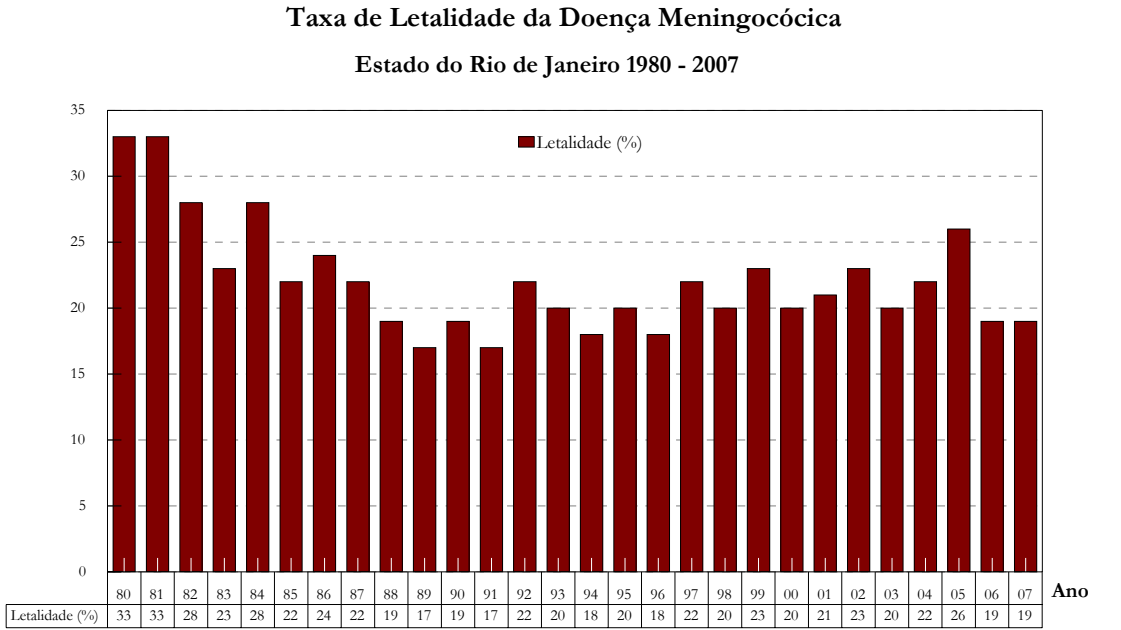


Gráfico 3 Série histórica das taxas de letalidade da doença meningocócica no Estado do Rio de Janeiro.

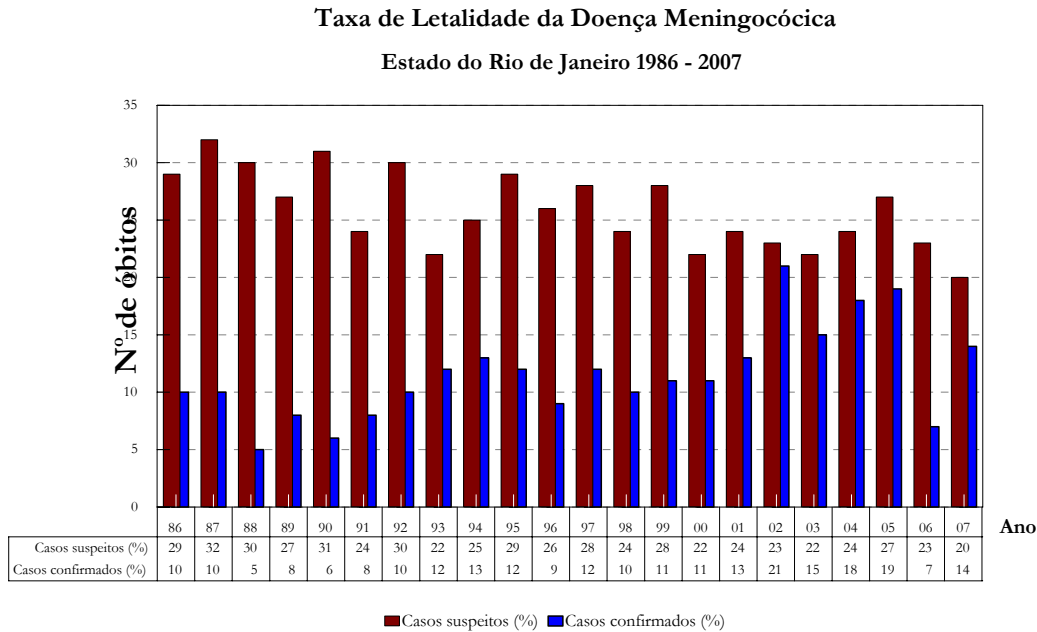
O quadro clínico de febre de início abrupto associado a múltiplas lesões cutâneas hemorrágicas é sugestivo de doença invasiva por *N. meningitidis*, o que permite ao médico o início imediato de antibiótico parenteral visando a etiologia meningocócica (Toews e Bass, 1974; Cartwright *et al.*, 1992; Hart e Rogers, 1993; Ragunathan *et al.*, 2000). O pronto reconhecimento da doença meningocócica é absolutamente essencial para o sucesso terapêutico (Slack, 1982). Início precoce de antibiótico parenteral, estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, transferência para um hospital de referência e retardo na realização da punção lombar em pacientes instáveis melhoram o prognóstico do paciente (Slack, 1982; Cartwright *et al.*, 1992; Hart e Rogers, 1993). Entretanto, a instituição do antibiótico antes da realização da punção lombar reduz o número de casos confirmados através da cultura (Cartwright *et al.*, 1992; Ragunathan *et al.*, 2000); um problema que pode ser minimizado através da utilização de ensaios de amplificação do ácido nucléico direto no líquido cérebro-espinhal (LCE) ou sangue (Ragunathan *et al.*, 2000; Taha, 2000; Corless *et al.*, 2001).

No Brasil, desde 1996, temos observado uma redução acentuada dos casos de meningite bacteriana confirmados por métodos laboratoriais tradicionais (bacterioscopia, cultura e teste do látex). O aumento da administração precoce de antibióticos, a descentralização do atendimento e a resistência dos médicos em realizar a punção lombar nos pacientes com diagnóstico clínico de meningite justificam, em parte, esta situação. Neste contexto a análise e o controle das meningites agudas ficam fortemente prejudicados, quando apoiados apenas nos métodos clássicos de diagnóstico laboratorial, afetando diretamente a implementação de medidas de prevenção e a avaliação de programas de imunização.

Os métodos tradicionais utilizados de rotina no diagnóstico etiológico das meningites bacterianas são: bacterioscopia (coloração pelo método de Gram), cultura (agar chocolate) e detecção de antígenos capsulares (teste de aglutinação do látex). A sensibilidade desses métodos é afetada por uma série de fatores, tais como o uso de antimicrobianos antes da coleta do espécime clínico, demora na realização do exame e a qualidade do laboratório de microbiologia (Thomson e Miller, 2003). Essas técnicas dependem de uma estrutura laboratorial adequada instalada próxima ao local de atendimento dos casos, já que o processamento do material deve ser feito idealmente nas primeiras 2h após a sua coleta. A positividade das culturas começa a ser afetada caso o LCE não seja semeado em até 15 minutos, devido à diminuição rápida da viabilidade dos três principais agentes etiológicos de meningite bacteriana (Thomson e Miller, 2003). Tal aspecto torna o diagnóstico etiológico da meningite difícil em áreas remotas, nos locais onde o atendimento é descentralizado, ou que dispõem de poucos recursos.

A doença meningocócica serve como uma doença sentinela para a qualidade do diagnóstico das demais meningites na comunidade, as quais dependem unicamente dos métodos de diagnóstico de laboratório para a confirmação da etiologia, devido à ausência de um critério clínico. De 2000 a 2005, a quase totalidade dos casos de doença meningocócica notificados no Rio de Janeiro foi diagnosticada apenas com base no critério clínico (72%; 1887/2618), o que aponta uma deficiência no papel do laboratório na confirmação dos casos de infecção bacteriana do sistema nervoso central (SNC) e de febres hemorrágicas. Naquele período, há ainda um indicativo de que os casos suspeitos (diagnóstico clínico) apresentaram uma evolução com maior gravidade (Gráfico 4), devido a uma letalidade em torno de 24% (95% IC 22-26%), comparada com a de 16% (95% IC

14-19%) para os casos confirmados ($\chi^2 = 13$; $P < 0,01$).



GEDMIR-Meningites/SESDEC/SES-RJ

Gráfico 4 Série histórica das taxas de letalidade de casos suspeitos (diagnóstico clínico) e de casos confirmados (métodos de bacteriologia convencional) de doença meningocócica no Estado do Rio de Janeiro.

Anote-se, porém que cerca de 40% dos pacientes com doença meningocócica desenvolvem meningite sem a presença de manifestações cutâneas, as formas clínicas com menores taxas de letalidade. O cálculo da letalidade estimado auxilia na avaliação e na percepção da doença meningocócica. Uma letalidade muito alta (>25%) sugere problemas na condução dos pacientes e, eventualmente, falha no diagnóstico dos casos menos graves. Isto indica a necessidade de uma revisão das rotinas de atendimento e uma investigação sobre a percepção dos médicos sobre a doença. Alternativamente, uma letalidade muito baixa (<5%) pode indicar que os casos mais graves não estão sendo notificados e, conseqüentemente, investigados e diagnosticados.

A aplicação do ensaio da reação da polimerase em cadeia (tradução do

inglês de *polymerase chain reaction - PCR*) tem sido uma prioridade, em diversos países, a fim de intensificar a vigilância das meningites. A técnica de PCR, baseada na detecção do *DNA* genômico da bactéria, extraído direto do espécime clínico, tem se mostrado um método rápido, fidedigno e que não é afetado pelo uso prévio de antibiótico ou pela coleta ou processamento tardio do LCE. A validação do método mostrou ser superior quando comparado com a cultura e métodos de aglutinação ou coaglutinação. A sensibilidade do ensaio de PCR é de 80%-90% e a especificidade de 90-100%, quando empregado o LCE (Taha, 2000; Corless *et al.*, 2001). No caso de sangue a sensibilidade é bastante inferior, ficando em torno de 50% (Newcombe *et al.*, 1996). Neste estudo, nós propusemos avaliar uma abordagem baseada no ensaio de PCR para a identificação das principais etiologias bacterianas de meningite seguida pela genogrupagem, em amostras biológicas de pacientes com meningite ou septicemia que desenvolveram exantema hemorrágico (púrpura) sem confirmação de uma etiologia pelos métodos de cultura ou detecção de antígeno.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Vigilância epidemiológica das doenças infecciosas

As primeiras intervenções estatais no campo da prevenção e controle das doenças, desenvolvidas sob bases científicas modernas, datam do início do século XX e foram orientadas pelos avanços da bacteriologia e pela descoberta dos ciclos epidemiológicos de algumas doenças infecciosas e parasitárias. Essas intervenções consistiam na organização de grandes campanhas sanitárias visando o controle de doenças que comprometiam a atividade econômica como, por exemplo, a febre amarela, a peste e a varíola. O modelo operacional baseava-se em atuações verticais, sob forte inspiração militar (Brasil, 2005b). Neste contexto, as primeiras medidas profiláticas para o controle da doença meningocócica foram propostas e implementadas em militares em campanha (Glover, 1918).

O termo vigilância epidemiológica passou a ser aplicado ao controle das doenças transmissíveis na década de 1950 e definia um conjunto de atividades desenvolvidas após a etapa de ataque da campanha de erradicação de uma doença. Originalmente, significava “a observação sistemática e ativa de casos suspeitos ou confirmados de doenças transmissíveis e de seus contatos”. Tratava-se, portanto, da vigilância de pessoas, com base em medidas de isolamento ou quarentena, aplicadas individualmente, e não de forma coletiva. Na década de 60, o conceito de vigilância epidemiológica foi expandido, permitindo a aplicação a vários problemas de saúde pública, além das doenças transmissíveis. Em 1965, é criada a Unidade de Vigilância Epidemiológica da Organização Mundial da Saúde (OMS) e,

em 1970, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) recomenda aos países membros o estabelecimento e manutenção de sistemas de vigilância epidemiológica. O objetivo é conhecer a dinâmica de ocorrência dos problemas de saúde e dos fatores que os condicionam para a definição de medidas adequadas de controle (Carvalho e Werneck, 1994).

No Brasil, a Campanha de Erradicação da Varíola (1966-73) é o marco da institucionalização das ações de vigilância no país. Em 1975, o Ministério da Saúde instituiu o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica, por meio de legislação específica (Lei nº 6.259/75 e Decreto nº 78.231/76), tornando obrigatória a notificação de doenças transmissíveis definidas pela portaria, na qual incluiu as meningites devido a forte pressão decorrente da epidemia de doença meningocócica no início da década de 1970.

O atual Sistema Único de Saúde (SUS) incorporou o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica em 1990, definindo na Lei 8.080 a vigilância epidemiológica como "o conjunto de atividades que permite reunir a informação indispensável para conhecer, a qualquer momento, o comportamento ou história natural das doenças, bem como detectar ou prever alterações de seus fatores condicionantes, com o fim de recomendar oportunamente, sobre bases firmes, as medidas indicadas e eficientes que levem à prevenção e ao controle de determinadas doenças".

A vigilância é, portanto, um tipo de estudo observacional que envolve o monitoramento constante da ocorrência de doenças em uma população, com o objetivo imediato de desencadear ações de controle (Thacker *et al.*, 1983). Entretanto, a aplicação dos sistemas de vigilância não se limita a ações imediatas, tendo também um importante papel na determinação das tendências e padrões de

longo prazo de ocorrência de doenças a nível local, estadual e nacional.

As doenças de notificação compulsória são definidas como patologias que podem colocar em risco a saúde dos contactantes e, eventualmente, da comunidade. O pronto reconhecimento de um surto de doença infecciosa pode levar a implementação de medidas de controle que limitam o impacto da doença na população e ajudam a prevenir surtos futuros (Dato *et al.*, 2004). A efetividade do sistema de notificação depende, em grande parte, da capacidade dos serviços locais de saúde – responsáveis pelo atendimento dos casos – de diagnosticarem corretamente as doenças e os agravos. Para isso, os profissionais devem estar tecnicamente capacitados e dispor de recursos complementares para a confirmação da suspeita clínica. Isto é especialmente importante para estratégias de quimioprofilaxia e imunoprofilaxia de patógenos relacionados com a ocorrência de casos secundários e/ou epidemias. A confirmação de uma etiologia é, também, fundamental para orientar a terapêutica específica e apoiar as ações de controle pela saúde pública.

O controle da doença meningocócica é uma das principais atividades da vigilância epidemiológica local, assim como outras patologias que exige qualquer medida imediata, seja para os casos, contatos íntimos ou grupos de risco. A redução do número de casos confirmados de doença meningocócica afeta diretamente o planeamento das medidas de controle. A confirmação da etiologia é importante para a instituição da quimioprofilaxia dos contactantes próximos dos casos de doença meningocócica sem o desenvolvimento de exantema hemorrágico. Além disto, a determinação do sorogrupo é absolutamente essencial para instituição de vacinação em situações endêmicas ou que exijam medidas imediatas de controle.

A definição de surto ou epidemias depende fundamentalmente do

monitoramento da ocorrência da doença em uma determinada população. De acordo com Benenson, epidemia "é a ocorrência, em uma comunidade ou região, de um conjunto de casos de natureza semelhante, claramente excessiva em relação ao normal esperado" (Puricelli *et al.*, 2004). O surto é um tipo de epidemia na qual os casos se restringem a uma área geográfica pequena e bem delimitada ou a uma população institucionalizada (creches, quartéis, escolas, etc.), durante um período de tempo medido em meses.

A incidência da doença meningocócica é influenciada, dentre outras coisas, pelo potencial de virulência da cepa circulante, por fatores do hospedeiro e por condições do meio ambiente. A incidência pode variar, dependendo da população, de níveis considerados raros até mais de 1000 casos/100.000 habitantes/ano. Comumente, ocorre como casos esporádicos (incidência abaixo de 1 caso/100.000 habitantes/ano) ou endêmicos (1-4 casos/100.000 habitantes/ano). Considera-se um nível hiperendêmico uma incidência entre 5 e 9 casos por 100.000 habitantes/ano (WHO, 1998). Alternativamente, um nível de incidência que não retorna aos parâmetros anteriores ao pico epidêmico, igualmente, é considerado hiperendêmico (McGuinness *et al.*, 1991).

As taxas de incidência são um dos parâmetros para o acompanhamento da doença meningocócica na comunidade, sempre com o interesse de observar mudanças no padrão epidemiológico. A incidência da doença meningocócica em períodos endêmicos em países como França e Estados Unidos, nos últimos anos, apresenta variação de menos de 1 caso/100.000 habitantes/ano, enquanto Inglaterra, País de Gales, Escócia e Espanha apresentam taxas de 4 a 5 casos/100.000 habitantes/ano, e em vários países do Norte e Centro da África de 15 a 20 casos/100.000 habitantes/ano (OMS, 1998). No Brasil, a taxa de incidência

neste século tem sido de 3 a 4 casos/100.000 habitantes/ano (SINAN, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde). Classicamente, uma epidemia é definida por uma taxa de incidência igual ou maior que 10 casos por 100.000 indivíduos/ano (WHO, 1998). Entretanto na África, onde a doença meningocócica é hiperendêmica e responsável por grandes epidemias, a OMS adota, para predição de epidemias, uma estratégia de controle baseada no modelo de limite máximo esperado do número de casos por semana. Quando o número de casos ultrapassa 15 por 100.000 habitantes por semana, durante duas semanas consecutivas, pode-se prever com significativa acurácia a ocorrência de uma epidemia. Desta forma, quando este limiar é ultrapassado, a vacinação em massa contra doença meningocócica é recomendada (Leake *et al.*, 2002).

Um surto de doença meningocócica pode ser definido como a ocorrência de três ou mais casos, associados a um mesmo sorogrupo, num período de poucos meses, restrito a uma área geográfica ou instituição. Surto em estabelecimentos de ensino pode ser definido como a ocorrência de 2 ou mais casos em um período inferior a seis meses (Hart e Rogers, 1993) ou três ou mais casos comprovados ou suspeitos em menos de três meses (Jackson *et al.*, 1995; CDC, 1997). Para escolas primárias e colegas de brincadeiras, alguns autores consideram como surto o registro de 2 ou mais casos em menos de 4 semanas (CDSC, 1995). Na ausência de um modelo com poder de predição, esses parâmetros são construídos na tentativa de reconhecer o mais rápido possível a ocorrência de situações emergenciais. O reconhecimento precoce do surto é fundamental para o melhor uso da vacinação de bloqueio na população afetada.

No entanto, fora do contexto da África não há um modelo com poder de predição de epidemias. O modelo tradicional preconizado pelo Ministério da Saúde -

diagrama de controle - verifica se a distribuição do número de casos ou a incidência da doença (média aritmética e desvios-padrão), registrados mensalmente (e.g, nos últimos dez anos, excluindo os dados dos anos epidêmicos), apresentam grandes variações. Por esta metodologia uma epidemia é definida quando os valores observados ultrapassam os dos limites máximo da variação esperada (Brasil, 2005a). Tal informação nem sempre permite a identificação de surtos localizados.

Para adoção das medidas de prevenção adequadas e efetivas é essencial que uma modificação do padrão epidemiológico seja reconhecida em uma fase inicial, o que depende fundamentalmente do diagnóstico etiológico dos casos de meningite e dos casos de febre com exantema hemorrágico. A eficiência máxima esperada para o controle de uma epidemia através da vacinação da população depende da cobertura de todas as faixas etárias a risco, assim como da sua implementação no início deste evento. Isso visa proteger o maior número possível de indivíduos e, conseqüentemente, reduzir ao máximo o número de casos de doença invasiva. A inclusão na rotina laboratorial de métodos com maior sensibilidade para a confirmação de casos por sorogrupo é fundamental para o controle adequado da doença, pois a estratégia de prevenção se baseia na instituição da quimioprofilaxia e no planejamento de vacinação sorogrupo específico.

2.2 Doença Meningocócica

2.2.1 Epidemiologia

Apesar de todo o avanço no diagnóstico e tratamento, desde a sua descoberta no século XIX, a doença meningocócica permanece como um grande desafio para a medicina. *N. meningitidis*, seu agente etiológico, é a principal causa

de meningite bacteriana adquirida na comunidade e de *purpura fulminans* (Hart e Rogers, 1993; Riordan *et al.*, 1995; Barroso *et al.*, 2002; Harrison, 2006). Mesmo em países desenvolvidos, as infecções invasivas por *N. meningitidis* ainda representam uma importante causa de adoecimento e morte na infância (Stephens, 2007).

Há uma ampla variação nas taxas de letalidade da doença meningocócica, que está relacionada, principalmente, com as diferentes apresentações clínicas, cujo espectro vai desde a bacteremia oculta até a septicemia fulminante. A letalidade global está estacionada entre 5 e 10%, podendo chegar a até 80% de acordo com a forma clínica, particularmente nos países em desenvolvimento, onde os recursos de assistência médica são escassos; reside ainda um grande potencial de causar seqüelas neurológicas permanentes ou mutilações em torno de 10-20% dos sobreviventes (Greenwood, 1991).

N. meningitidis comporta-se como um parasita estenoxeno, com uma exigência específica para *Homo sapiens*, seu único hospedeiro natural. Conhecido como um comensal estrito das mucosas do trato respiratório superior, eventualmente, pode ser encontrado em outros locais como o colo do útero, a uretra e a mucosa anal. A sua morfologia é de cocos Gram negativos, normalmente dispostos em pares (diplococos), em forma de feijão ou rim, com 0,6-0,8 μ de diâmetro. Não formam esporos ou possuem flagelos na superfície externa, porém a presença de fímbrias ("pili") é notada com freqüência. A superfície externa é revestida por uma cápsula em virtualmente todas as amostras de pacientes e em cerca de 50% do material de portadores; raramente cepas não capsuladas causam doença.

O ciclo de transmissão da doença meningocócica é definido basicamente por três fatores: (i) diferentes características de virulência das cepas ou clones de *N.*

meningitidis; (ii) reservatório humano – portador – e dinâmica da exposição ao meningococo (e.g., transmissão respiratória, aquisição e infecção assintomática); (iii) susceptibilidade do grupo exposto. A incidência da doença meningocócica aumenta quando há introdução de uma cepa com alto potencial patogênico, na presença de fatores que aumentam a transmissibilidade de *N. meningitidis*, e/ou quando a resistência do hospedeiro à infecção invasiva está diminuída (Stephens, 2007). Há diversos fatores de risco conhecidos para infecção assintomática e doença invasiva relacionados à bactéria (cápsula, proteínas da parede celular, e fímbrias), ao meio ambiente (aglomeração, confinamento, tabagismo ativo/passivo e desigualdade social) e ao hospedeiro (idade, contato boca-a-boca, sexo oral, infecção pelo vírus influenza, anemia falciforme e deficiência de IgM, das frações finais de complemento, de properdina ou de lecitina fixadora de manose) (Wall *et al.*, 1991; Ronne *et al.*, 1993; Edmond *et al.*, 1995; Imrey *et al.*, 1996; Cookson *et al.*, 1998).

N. meningitidis deve ser considerada como um parasita eficiente, que se mantém em qualquer população humana através de infecções subclínicas, associada ou não a casos de doença. A transmissão ocorre de uma pessoa para outra através do contato com secreções respiratórias e gotículas. A bactéria é extremamente sensível às condições adversas, não apresentando resistência à dessecação, aos raios solares e às variações de temperatura. A sobrevivência em temperatura ambiente com baixa umidade não ultrapassa três horas, fazendo com que a sobrevivência no ambiente não seja possível por muito tempo (Wilson e Miles, 1964; WHO, 1970). Em períodos não epidêmicos, cerca de 10% dos indivíduos são portadores assintomáticos (infecção subclínica) de *N. meningitidis* nas vias aéreas superiores. Em crianças menores de 4 anos, esta proporção é menor (< 3%), aumentando de acordo com a faixa etária, chegando a 24-37% no grupo entre 14 e

25 anos (Caugant *et al.*, 1994). A proporção entre doença e infecção subclínica é baixa durante períodos endêmicos, variando de um caso para cada mil a cinco mil portadores (Palmer *et al.*, 1992).

A presença de *N. meningitidis* na orofaringe estimula a produção de anticorpos, sendo um importante fator protetor contra o adoecimento futuro. Em até 25% dos indivíduos, o estado de portador assintomático pode ser prolongado (meses), em 35% é curto (dias a semanas) e no restante dos indivíduos é infrequente ou transitório (Tzeng e Stephens, 2000). Algumas situações aumentam a taxa de transmissão e a proporção de portadores assintomáticos, como é o caso de populações confinadas – militares aquartelados ou em campanha, prisioneiros, internos, asilados –, populações aglomeradas – alojamento conjunto, creche, manifestações religiosas, transporte de massa, escolas de tempo integral –, ou contatos íntimos de um caso de doença (Greenwood *et al.*, 1985; Stuart *et al.*, 1988). Comportamentos sociais também estão relacionados com maior risco de aquisição de *N. meningitidis* (MacLennan *et al.*, 2006). Uma maior incidência da doença nos adolescentes tem uma importante implicação em saúde pública devido à extensa rede de contatos sociais e a possibilidade de aquisição da infecção no trabalho, no local de estudo ou em atividades sociais. Conseqüentemente, vários surtos causados pelo sorogrupo C já foram relatados em escolas, universidades e locais para encontros sociais (Wall *et al.*, 1991; Ronne *et al.*, 1993; Edmond *et al.*, 1995; Imrey *et al.*, 1996; Cookson *et al.*, 1998).

Os fatores que determinam o adoecimento após a colonização por *N. meningitidis* não são totalmente estabelecidos, mas a redução na atividade bactericida no soro humano está claramente associada ao risco de doença. A ausência de anticorpos protetores é o fator de risco isolado mais importante para o

desenvolvimento de doença meningocócica, mas polimorfismo genético e outros cofatores do hospedeiro também contribuem para o adoecimento (Goldschneider *et al.*, 1969b; Goldschneider *et al.*, 1969a; Emonts *et al.*, 2003). A queda dos anticorpos maternos, adquiridos por via transplacentária, ao longo dos primeiros três meses de vida aumenta o risco de doença nos lactentes, o grupo etário mais afetado. Esse risco aumentado para o desenvolvimento de doença invasiva se estende até os 2 anos de idade, período denominado de “imunodeficiência fisiológica”. Ao longo da infância, os níveis séricos de anticorpos bactericidas vão aumentando progressivamente, reduzindo concomitantemente a incidência da doença (Goldschneider *et al.*, 1969b; Goldschneider *et al.*, 1969a). Um novo aumento do número de casos ocorre nos adolescentes e adultos jovens (14 a 24 anos), provavelmente devido as mudanças comportamentais, o que acarreta um aumento da transmissão e da aquisição, além da associação de algumas cepas com doença nestes grupos etários (Jones e Mallard, 1993; Rosenstein *et al.*, 1999). Em situações endêmicas, a doença pelo sorogrupo B é mais comum em crianças com menos de 6 anos de idade, pelo sorogrupo C em adolescentes e pelo sorogrupo A em crianças acima de 5 anos e adolescentes. Durante epidemias, pode ocorrer uma mudança no perfil epidemiológico da doença com um deslocamento das faixas etárias acometidas em direção aos indivíduos adolescentes e adultos jovens (Peltola *et al.*, 1982).

A distribuição dos casos de doença meningocócica por sexo mostra uma predominância no sexo masculino. Entretanto, quando os casos são estratificados por grupos etários fica claro um predomínio da doença em mulheres acima dos 49 anos de idade (Barroso, 1998). Isto tem sido há tempos reconhecido na literatura médica (Beeson e Waterman, 1943), mas na Europa há, também, uma

preponderância de doença em mulheres (M: F = 0.94) entre 15 e 17 anos (Jones e Mallard, 1993; Scholten *et al.*, 1994). Apesar da influência do sexo feminino na letalidade já ter sido relatada (Scholten e Bijlmer, 1995), este achado não foi confirmado por outros autores (Stephens *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 1997; Harrison *et al.*, 2001).

N. meningitidis pode ser classificada através de antígenos da superfície externa em sorogrupos (polissacarídeo capsular), soro-subtipos (proteínas da parede celular) e imunotipos (lipooligossacarídeos - LOS). São reconhecidos 12 sorogrupos designados por letras capitais: A,B,C,X,Y,Z,29E,W₁₃₅,H,I,K e L. Atualmente, o sorogrupo D não é mais reconhecido de forma individualizada (Koneman *et al.*, 1997). Os diferentes polissacarídeos capsulares de ácidos siálicos (B, C, Y e W₁₃₅) e sem ácido siálicos (A) expressos por *N. meningitidis* são os principais fatores de virulência, e são usados como marcadores epidemiológicos e componentes de vacinas. A composição dos polissacarídeos capsulares B, C, Y e W₁₃₅, que são homopolímeros, são compostos inteiramente por ácidos siálicos ou ácidos siálicos ligados à glicose ou galactose, enquanto a cápsula do sorogrupo A foi demonstrada como sendo um homopolímero de uma hexosamina fosforilada (d-manosamina-1-fosfato) parcialmente N- e O-acetilada (*N*-acetil manosamina-1-fosfato). A classificação por sorogrupos é baseada nas propriedades imunobiológicas dos polissacarídeos capsulares e identificados pelas técnicas de soroaglutinação, coaglutinação, pesquisa de anticorpos monoclonais, ou por ensaio de PCR (Olcen *et al.*, 1978).

As cepas de *N. meningitidis* são subdivididas de acordo com a especificidade imunológica das principais proteínas e dos lipooligossacarídeos da membrana externa. Das cinco classes de proteínas de membrana externa descritas,

a de classe 5 (Opa e Opc) é hipervariável, sofrendo variações de fase durante a infecção, enquanto a de classe 4 é estável entre as diferentes cepas. Portanto, estas duas classes não são úteis para classificação das diferentes amostras isoladas em cultura. As proteínas de classes 1, 2 e 3 são porinas, e fazem parte do esquema de soro-subtipagem. As proteínas de classes 2 e 3, mutuamente excludentes, definem os sorotipos codificados por uma das 4 (VR1, VR2, VR3, VR4) regiões variáveis do *locus porB*. As proteínas de classe 1 determinam os subtipos, os quais são a expressão do *locus porA*, constituídos por 2 (VR1 e VR2) das 3 regiões variáveis descritas. As regiões variáveis ampliam a diversidade antigênica, permitindo a modulação da variação de fase e, conseqüentemente, da expressão das proteínas como um mecanismo de evasão e adaptação ao meio ambiente. Os lipooligossacarídeos presentes na parede celular definem os diferentes imunotipos. Entretanto, devido à variação de fase, diferentes epítomos ou epítomos incompletos podem estar presentes na mesma bactéria, tornando a imunotipagem pouco útil para fins de classificação (Figura 1).

Convencionalmente, pela classificação fenotípica atual, uma cepa de *N. meningitidis* é subdividida pelo sorogrupo, sorotipo e subtipo, podendo às vezes ser seguido do imunotipo. Por exemplo, *N. meningitidis* pode ser sorogrupo B, sorotipo 4,7, subtipo P1.19,15 ou P1.7,1, descrita como B:4,7:P1.19,15 ou B:4,7:P1.7,1, os dois principais perfis antigênicos de isolados clínicos no Brasil.

O esquema de classificação fenotípica (sorogrupo/soro-subtipo) permanece como um bom método para a vigilância epidemiológica e o planejamento de estratégias de imunização. Entretanto, esta classificação tem limitações, pois se baseia em características expressas na superfície da célula, que estão sujeitas a variações em resposta a pressão de seleção.

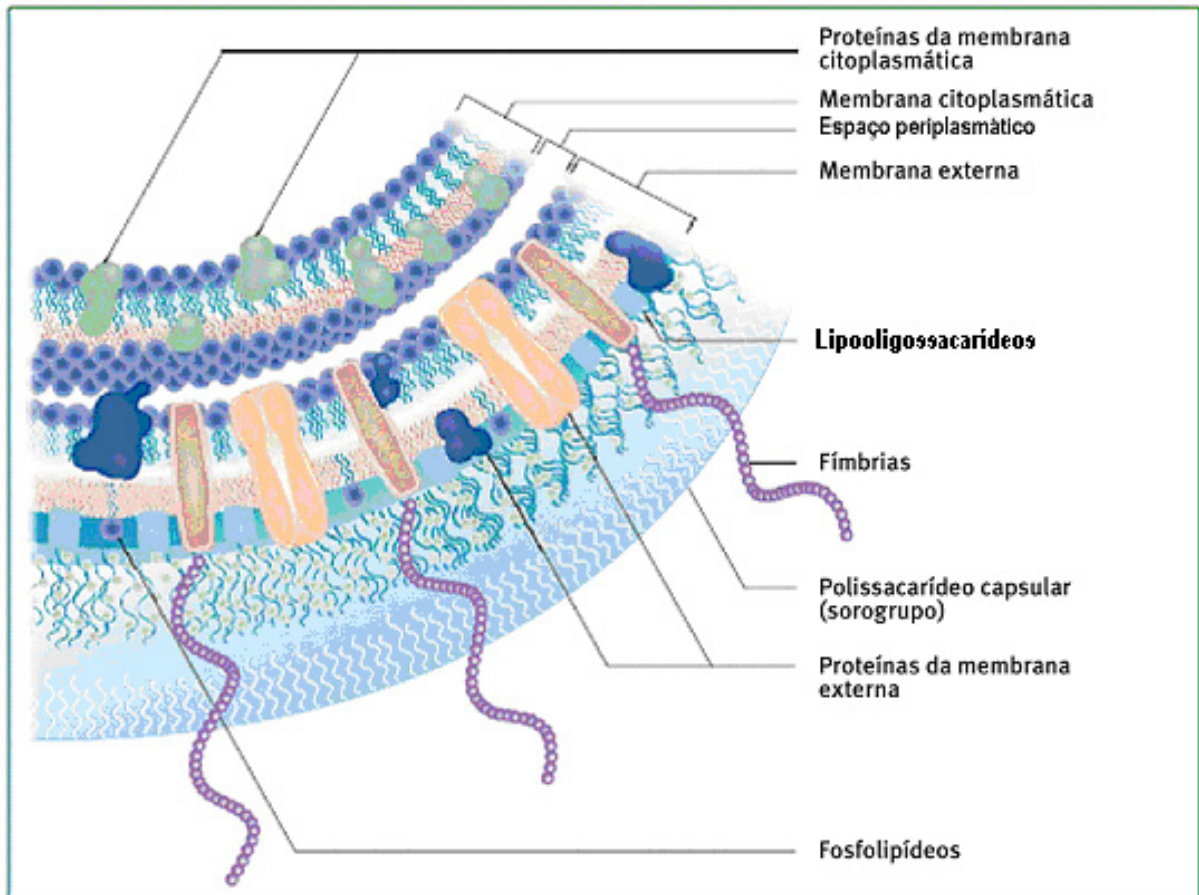


Figura 1 Corte da parede celular de *N. meningitidis* (adaptado de Stephens *et al.*, 2007).

Dos sorogrupos de *N. meningitidis* descritos, cinco (A, B, C, W₁₃₅ e Y) estão relacionados com mais de 90% dos casos de doença invasiva em todo o mundo. Os sorogrupos B e C são responsáveis pela maioria dos casos na Europa e no Continente Americano, enquanto os sorogrupos A, C e W₁₃₅ predominam na Ásia e África (Figura 2) (Caugant, 1998; WHO, 1998; Rosenstein *et al.*, 1999). No Brasil, os sorogrupos B, C, W₁₃₅ e Y correspondem a 99% dos casos reportados ao Centro Nacional de Referência para as Meningites; os demais são relacionados aos sorogrupos A, X, Z e 29E, ou a amostras não-grupáveis (NG) (Lemos *et al.*, 2006).

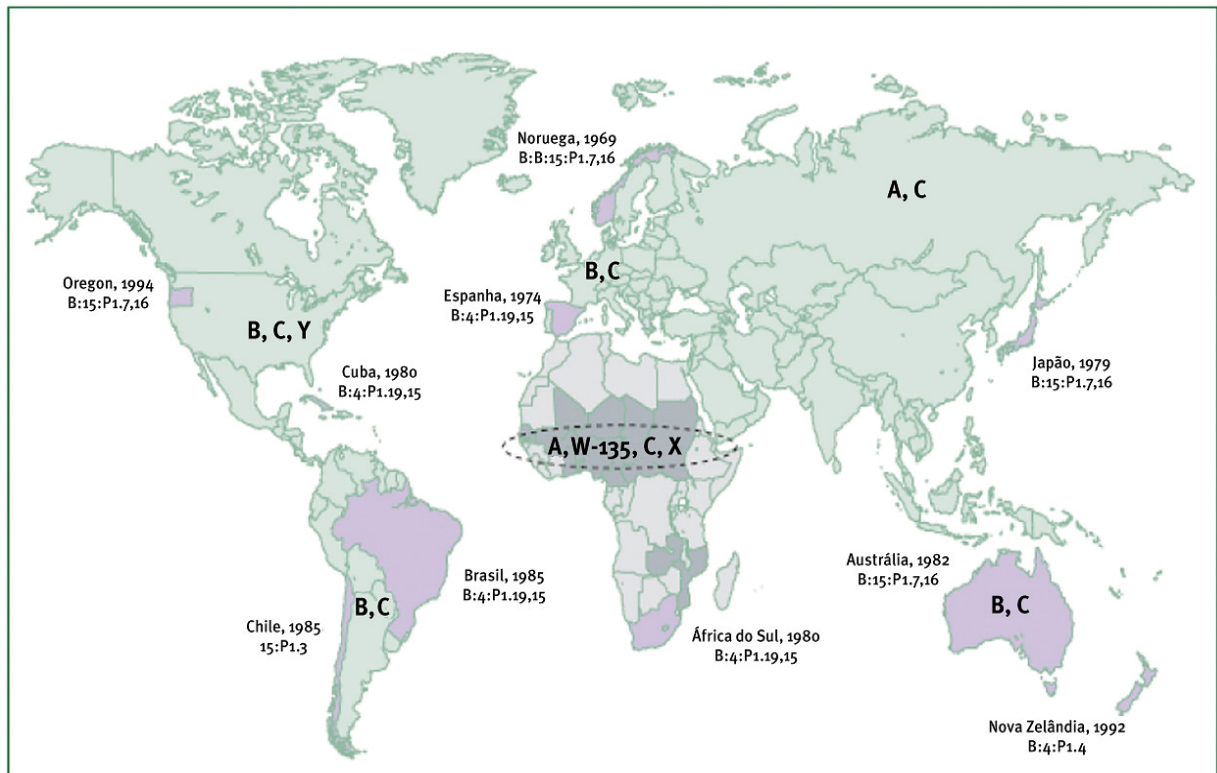


Figura 2 Distribuição geográfica dos principais sorogrupos de *N. meningitidis* no mundo e dos surtos causados pelo sorogrupo B por sorotipos (adaptado de Stephens *et al.*, 2007).

A incidência do sorogrupo Y vem apresentando aumento significativo em alguns países, como em Israel, Suécia, Estados Unidos e, recentemente, Colômbia (Rosenstein *et al.*, 1999). De 1996 a 1998, um terço dos casos de doença meningocócica nos Estados Unidos foi causado pelo sorogrupo Y (ET-508) (Connolly e Noah, 1999; Rosenstein *et al.*, 1999). Na Colômbia, se observou um aumento inesperado do sorogrupo Y a partir de 2003 e em 2006 este sorogrupo foi responsável por 50% dos casos diagnosticados (Ines Agudelo *et al.*, 2008). O sorogrupo W₁₃₅ era uma causa rara de doença meningocócica até o ano de 2000, quando foi descrito o primeiro surto causado por esse sorogrupo em peregrinos para Meca durante o Hajj (peregrinação islâmica anual) e em seus contactantes em diferentes países de origem (Popovic *et al.*, 2000).

A doença meningocócica tem distribuição global através de casos esporádicos, surtos ocasionais e epidemias em localidades, países ou continentes

(Caugant, 1998). Estima-se a ocorrência de pelo menos 500 mil casos novos anuais de doença meningocócica no mundo, com 50.000 óbitos. A África é a região com maior número de casos de doença meningocócica no mundo, principalmente na região semi-árida subsaariana, conhecida como “cinturão da meningite”, que se estende do Senegal até a Etiópia, afetando cerca de 15 países (Figura 3). Esta designação – “cinturão da meningite” – foi proposta, em 1963, por Lapeyssonnie durante uma missão da OMS na África. Nesta região, a doença meningocócica representa uma ameaça há, pelo menos, 100 anos, com epidemias recorrentes a cada 8 a 12 anos, especialmente na estação seca quando a umidade do ar é muito baixa e a concentração de partículas de poeira é muito alta (Michele *et al.*, 2006). Frequentemente, resulta em uma taxa de ataque 500 a 1000 vezes maior do que a da população de um país do hemisfério norte ocidental. Alternativamente, em algumas partes do mundo, por razões que não são bem esclarecidas, a doença meningocócica tem uma taxa de incidência persistentemente baixa (México, parte da Ásia e da África, áreas da América Central e do Sul) com poucos ou nenhum surtos relatados (Stephens, 2007).



Figura 3 Países que constituem o Cinturão da Meningite na África (disponível em: www.cdc.gov).

No Brasil, relatos sugestivos da ocorrência de casos de doença meningocócica datam do século XIX. Em 1842, um surto da doença teria ocorrido entre militares sediados na Praia Vermelha, na cidade do Rio de Janeiro (Almeida, 1921). Entretanto, os registros oficiais da doença no país se iniciam no século XX. Na primeira década daquele século, a doença meningocócica era diagnosticada esporadicamente, ocorrendo somente na forma de casos importados. Os primeiros

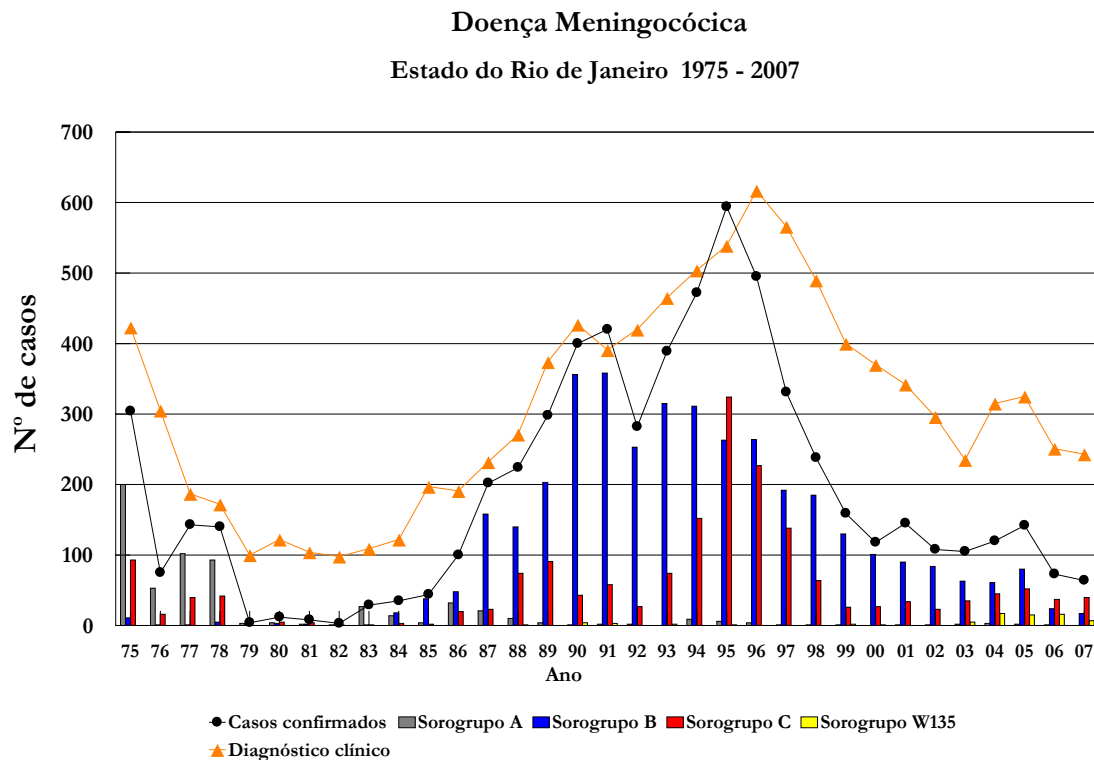
casos confirmados laboratorialmente foram descritos em 1902 na cidade do Rio de Janeiro (Vieira, 1916) e em 1906 na cidade de São Paulo (Junqueira, 1914). Esta doença passou a ser descrita como autóctone pela primeira vez em 1916 (Vieira, 1916).

O relato da primeira epidemia de doença meningocócica no Brasil data de 1920, cujo estudo foi apresentado por Renzo, descrevendo, através de notas e observações, a epidemia que ocorreu no Rio de Janeiro (Renzo, 1921). Entre 1921 e 1923 a incidência da doença na cidade de São Paulo ultrapassou 10 casos por 100.000 habitantes, porém, equivocadamente, não foi oficialmente caracterizada como uma epidemia (Assumpção, 1929). A segunda onda epidêmica descrita no Brasil, entre 1947 e 1948, foi observada na região mogiana de São Paulo, envolvendo várias cidades vizinhas (Gomes, 1950). Note-se, porém, que outras situações epidêmicas devem ter ocorrido sem que seu registro tenha sido publicado.

A doença meningocócica ficou sem a devida atenção das autoridades até a década de 70, o que sempre foi um descaso fora da Região Sudeste, quando uma epidemia de grandes proporções causada pelo sorogrupo C (C:2a:P1.5, 1.2), seguida pelo sorogrupo A (A:4:P1.9), afetou todas as Regiões do Brasil, chegando a atingir taxas de incidência de até 170 casos por 100.000 habitantes/ano em determinadas cidades, como em São Paulo (Guibourdenche e Riou, 1996; de Lemos *et al.*, 2007). Com este acontecimento, em 1975, o Ministério da Saúde iniciou a organização do sistema nacional de vigilância epidemiológica das meningites e implementou uma campanha de vacinação contra os sorogrupos A e C (Doença meningocócica no estado da Guanabara, 1974; Meningites no Brasil em 1976, 1977). No Rio de Janeiro o laboratório passou novamente a ter um papel na identificação de patógenos meníngeos em 23 de setembro de 1974 (Doença

meningocócica no estado da Guanabara, 1974), uma atividade que foi interrompida em algum momento por volta da metade do século passado.

A partir de 1985, houve uma importante mudança no comportamento epidemiológico da doença meningocócica no Brasil, com o desaparecimento do sorogrupo A, um declínio marcante do sorogrupo C, acompanhado pela emergência do sorogrupo B, inicialmente caracterizado como B:4:nt (Gráfico 5) (Lemos *et al.*, 2006) . Este padrão seguiu a tendência observada, desde o final da década de 1970, na Europa, América, Caribe, Sul da África, Oceania e Japão.

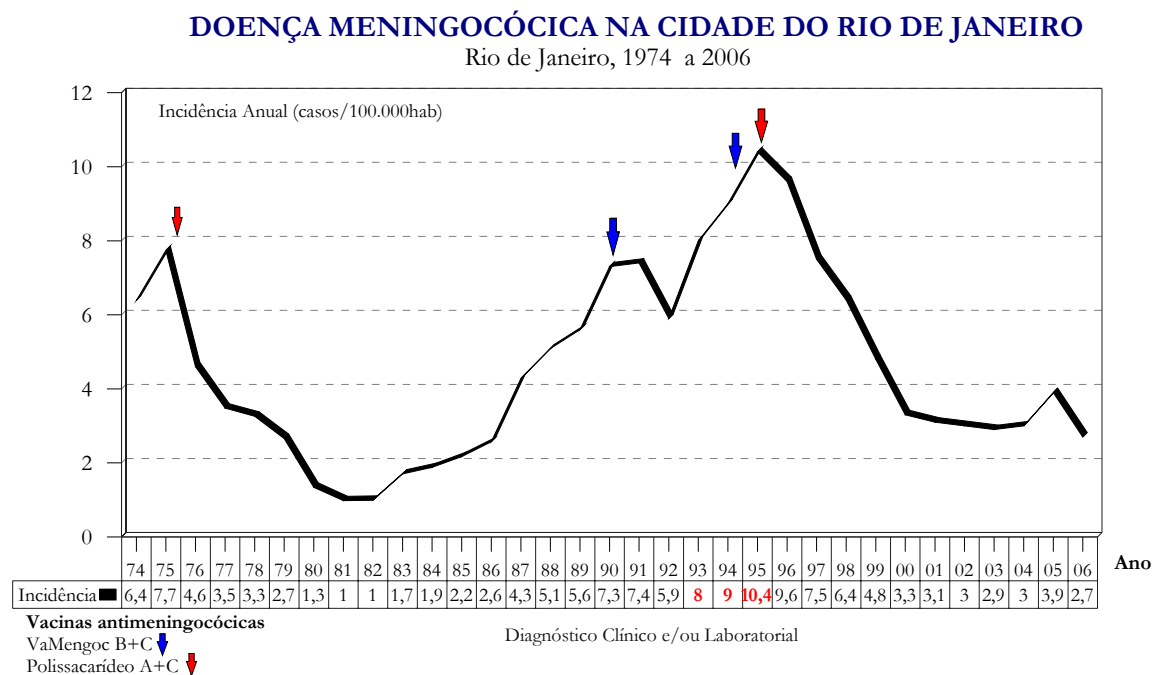


GEDMIR-Meningites/SESDEC/SES-RJ

Gráfico 5 Série histórica da distribuição dos diferentes sorogrupos de *N. meningitidis* no Estado do Rio de Janeiro.

Em 1990, a taxa de incidência da doença meningocócica no Rio de Janeiro chegou a 7,3 casos por 100.000 habitantes, com o predomínio do sorogrupo B, sorotipo 4 (82%) e subtipos P1.15 (45%) ou nt (55%), o que levou a implementação

de uma campanha de vacinação em massa, utilizando a vacina antimeningocócica subcapsular B+C (VaMengoc B+C[®]) produzida em Cuba (Gráfico 6). A população alvo desta campanha foram crianças de 6 meses a 9 anos de idade (Noronha *et al.*, 1995). Todavia, o impacto desta intervenção nos anos seguintes não foi significativo na redução da incidência da doença causada pelo sorogrupo B.



GIE/CEP/SSC/SMSRJ

Gráfico 6 Série histórica da incidência anual de doença meningocócica na cidade do Rio de Janeiro e das campanhas de vacinação implementadas pelo Ministério da Saúde.

A despeito daquela campanha de vacinação em 1990, a partir de 1993 observa-se um aumento do número de casos de doença por *N. meningitidis* sorogrupo C, resultando em uma epidemia no ano seguinte. A campanha de vacinação com a VaMengoc B+C[®] foi estendida para todas as crianças até 13 anos de idade. Entretanto esta estratégia não levou em consideração a alteração do perfil da população atingida, com um reconhecido aumento da incidência em faixas etárias mais elevadas. Em 1995, a epidemia atinge o seu máximo, com incidência de >10

por 100.000 habitantes. O sorogrupo C representava 57% dos isolados, caracterizados principalmente como sorotipos 2b (65%) ou 2a (21%); das cepas C:2b, 93% eram não subtipadas (nt) (Barroso, 1998). Naquele ano, uma nova campanha com a vacina polissacarídica A + C foi implementada para a população na faixa etária de 14 a 30 anos, com um impacto significativo na redução do número de casos na comunidade (Gráfico 6). A partir de 2003, observa-se um novo aumento do número de casos pelo sorogrupo C, concomitante a um aumento do sorogrupo W₁₃₅ em isolados clínicos, que até então era uma causa rara de doença meningocócica no Brasil (Barroso e Rebelo, 2007). No período entre 1998 e 2002 o sorogrupo W₁₃₅ foi responsável por 0,3% dos casos confirmados, enquanto que de 2003 a 2005 representou 11%. As bactérias isoladas expressam o mesmo fenótipo do clone associado aos surtos relacionados ao Hajj, identificado como W₁₃₅:2a:P1.5, 1.2 – ST 11.

Nas últimas décadas, a utilização da tipagem genética, como eletroforese de multilocus enzimático (tradução do inglês de *multilocus enzyme electrophoresis* - MLEE) e tipagem por seqüenciamento de multilocus (tradução do inglês de *multilocus sequence typing* - MLST), tem contribuído muito para a identificação da expansão de clones patogênicos e para o entendimento da dinâmica de transmissão de *N. meningitidis* (Caugant *et al.*, 1986; Caugant *et al.*, 1988; Achtman, 1994; Caugant *et al.*, 1994; Raymond *et al.*, 1997; Swartley *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; Maiden *et al.*, 1998). Estudos epidemiológicos, baseados em métodos moleculares, revelam um panorama complexo de disseminação de *N. meningitidis*, onde uns poucos clones patogênicos são responsáveis por surtos e epidemias em todas as partes do mundo (Caugant, 1998).

O multilocus enzimático identifica a ocorrência de variações alélicas em

genes essenciais (*housekeeping*), através da observação de diferentes padrões eletroforéticos de enzimas codificadas por 10 ou 13 genes selecionados. Os perfis alélicos, designados de tipos eletroforéticos (tradução do inglês de *electrophoretic types* - *ET*), correspondem ao multilocus genético das enzimas dos microorganismos. O multilocus seqüenciado identifica variações nas seqüências das regiões internas dos genes codificadores das isoenzimas, através da pesquisa de apenas 7 genes daqueles selecionados para o MLEE. Os perfis são definidos como tipos seqüenciados (tradução do inglês de *sequence types* - *ST*).

Através da utilização da técnica do multilocus enzimático ou do multilocus seqüenciado, observou-se que apesar de vários tipos genéticos descritos, menos de 10 complexos clonais englobam os principais tipos atualmente responsáveis pela maioria dos casos de doença meningocócica invasiva no mundo (Tabela 1) (Caugant, 1998). Alguns clones são altamente patogênicos, devido à alta probabilidade da colonização da nasofaringe resultar em doença, principalmente quando são introduzidos pela primeira vez em uma população. As cepas do complexo clonal ST-11, por exemplo, que geralmente expressam cápsulas do sorogrupos B, C ou W₁₃₅, podem causar doença invasiva na proporção de um caso para cada 20 a 400 infecções (Raymond *et al.*, 1997).

Tabela 1 Descrição dos principais complexos clonais relacionados à doença meningocócica invasiva e distribuição geográfica

<i>MLEE – ET¹</i>	<i>MLST – ST²</i>	<i>FENÓTIPO</i>	<i>DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA</i>
Subgrupo I	ST-1	Sorogrupo A 4,21:P1.10 - P1.20,9 - P1.7,10	Global – Pandêmico
Subgrupo V	ST-4	Sorogrupo A 4,21:P1.10 - P1.20,9 - P1.7,10	China – Epidêmico
Subgrupo III	ST-5	Sorogrupo A 4,21:P1.10 - P1.20,9 - P1.7,10	Global – Pandêmico
ET-37	ST11	Sorogrupo C (B) - W135, Y 2a:P1.5,2 – P1.5 - P1.2	Global – Epidêmico
Cluster A4	ST-8	Sorogrupo C (B) 2b:P1.2 - P1.3 - P1.10	Continente Americano, Europa, África do Sul – Epidêmico
ET-5	ST32	Sorogrupo B - C 4:P1.15 - P1.7; 15:P1.16 - P1.3	Global – Hiperendêmico
Linhagem III	ST-41 e 44	Sorogrupo B - C 4:P1.4	Europa, Nova Zelândia – Hiperendêmico

¹complexo, subgrupo, cluster, ou linhagem. ²complexo. () = sorogrupo originalmente associado ao clone.

No Rio de Janeiro, entre 2001 e 2006, o percentual de casos confirmados de doença meningocócica encontra-se extremamente reduzido, em média de 28%, o que tem afetado em muito a vigilância epidemiológica e o entendimento da dinâmica da disseminação da doença (Gráfico 5). No mesmo período foram notificados 1340 casos de meningite bacteriana inespecífica (G00.9, ISCD-10), i.e., casos de meningite piogênica sem um exantema sugestivo. Cerca de 40% ou mais dos pacientes com doença meningocócica desenvolvem meningite sem a presença de manifestações cutâneas. Assim, quando não há confirmação laboratorial do agente etiológico, esses casos são notificados como meningite bacteriana inespecífica, de modo que não são incluídos como casos suspeitos de doença meningocócica e nenhuma ação é adotada. Recentemente, Tuyama e cols. (2008) demonstraram que

a principal etiologia bacteriana desses casos de meningite (G00.9, ISCD-10) é *N. meningitidis*. O não reconhecimento desta categoria na classificação da doença meningocócica introduz erros nas estatísticas oficiais, subestimando a incidência na população e superestimando o percentual de formas purpúricas. Neste contexto, a fonte de informação da doença meningocócica para a tendência de longo prazo fica fortemente prejudicada, assim como a construção do diagrama de controle, resultando em falhas na adoção das medidas de prevenção em contactantes próximos e na população em geral.

2.2.2 Fisiopatogenia

O desenvolvimento de infecção invasiva por *N. meningitidis*, uma bactéria de transmissão respiratória, tem início com a colonização da nasofaringe, seguida pela invasão da corrente sangüínea de um hospedeiro susceptível. Estruturas da superfície bacteriana são fundamentais para a aderência às células epiteliais não ciliadas da nasofaringe, evasão dos mecanismos de defesa local e subsequente estabelecimento da colonização. Essas estruturas ou adesinas não somente permitem a colonização da mucosa humana, mas, também, estimulam uma seqüência de sinais em células fagocíticas (Figura 4). A ativação desse caminho é essencial para a penetração na célula e a acomodação intracelular, assim como a indução de liberação precoce de citocinas (Stephens e Farley, 1991; Meyer *et al.*, 1994; Meyer, 1999; van Deuren *et al.*, 2000).

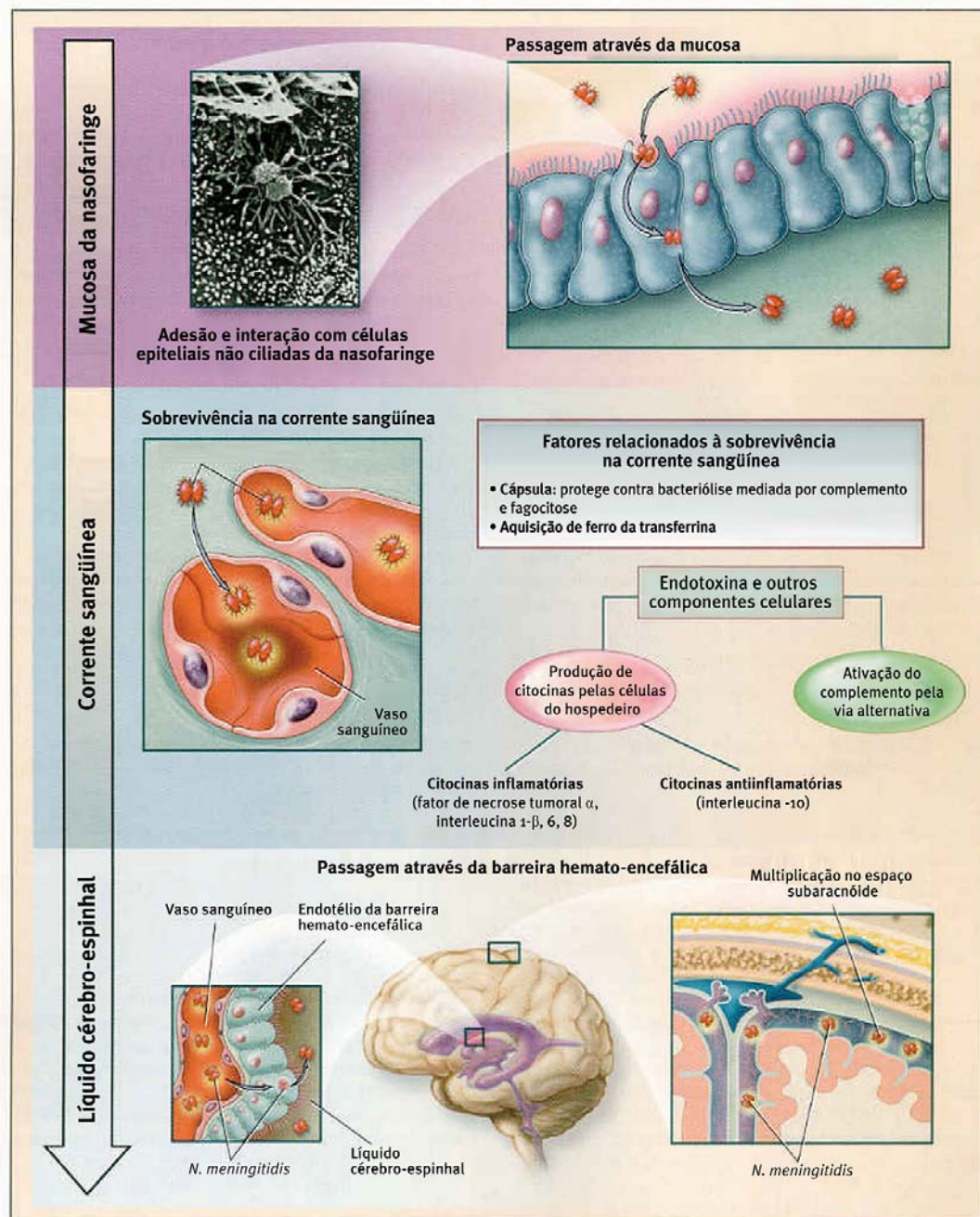


Figura 4 Esquema da fisiopatogenia da doença meningocócica invasiva (adaptado de Rosentein *et al.*, 2001).

Pelo menos quatro condições são essenciais para o desenvolvimento da doença meningocócica invasiva: (i) exposição a uma cepa patogênica, (ii) colonização da nasofaringe, (iii) invasão através da mucosa, (iv) sobrevivência e multiplicação na corrente sanguínea. Estes processos são influenciados por características bacterianas específicas, condições climáticas, contextos sociais,

infecção viral das vias respiratórias recente e condição imunológica do paciente. Os estudos sobre o estado de portador contribuem de forma significativa para o entendimento da história natural e da fisiopatogenia da doença. Quando a colonização inicial da nasofaringe está estabelecida, em geral, não há progressão para doença, mesmo em condições epidêmicas. A capacidade de causar doença invasiva não é igual para todos os sorogrupos ou cepas de meningococo. Sorogrupos A, B, C, W₁₃₅ e Y são os mais invasivos, em comparação com os demais; as bactérias não capsuladas são, em geral, avirulentas. A aquisição de uma bactéria patogênica depende do contato íntimo e prolongado entre um indivíduo colonizado e um susceptível. *N. meningitidis* é transmitido de uma pessoa para outra através do contato direto com secreções da nasofaringe ou por gotículas. A doença meningocócica, em geral, ocorre do 1^o ao 14^o dia após a aquisição de uma cepa patogênica (Tzeng e Stephens, 2000).

N. meningitidis possuem importantes adesinas na superfície externa da célula bacteriana, denominadas de fímbrias ou pili. As fímbrias são reconhecidas como o componente provável mais importante da etapa inicial de adesão às células da nasofaringe (Corbett *et al.*, 2004). Essas estruturas são apêndices filamentosos compostos por material protéico, que se estendem por distâncias variáveis da superfície bacteriana. Cada fímbria individual ou pilus é formada por aproximadamente 10.000 subunidades protéicas repetidas. A exposição máxima desta estrutura aparece na ausência da cápsula. A presença de fímbrias é um fator importante para a colonização da superfície mucosa do hospedeiro e para alguns estágios da infecção invasiva pelo meningococo (Figura 5).

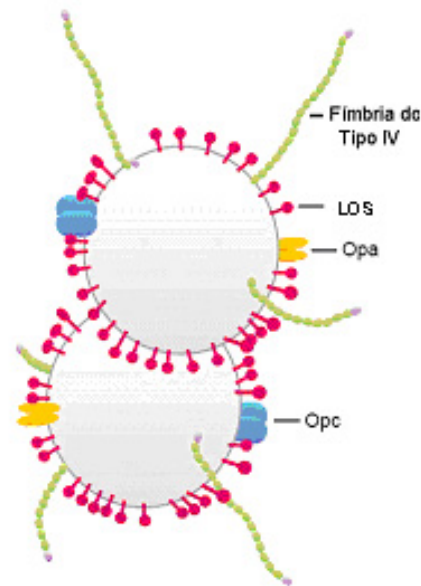


Figura 5 Representação esquemática das proteínas de adesão do meningococo (adaptado de Corbett *et al.*, 2004). LOS: lipooligosacarídeo; Opa e Opc: proteínas associativas de opacidade.

As fímbrias podem sofrer variações antigênicas e de fase, que se correlacionam com a localização da bactéria no hospedeiro. A capacidade em produzir uma fase sem fímbrias (variação de fase) permite o deslocamento de uma superfície para outra, durante a invasão do hospedeiro, e é explorado pelas neissérias patogênicas. A reversão para uma fase com fímbrias pode permitir a adesão ao alcançar o novo local de infecção, primariamente as meninges e o endotélio dos vasos da pele. As variações antigênicas, modificando a seqüência de aminoácidos das subunidades, podem auxiliar a bactéria no processo de invasão de diferentes tecidos durante o curso de uma infecção. Essas mudanças constantes na expressão dos antígenos das fímbrias criam uma sucessão de estímulos antigênicos diferentes e assim evitam o sistema imune do hospedeiro (de Vries *et al.*, 1996; Meyer, 1999).

Após alcançarem a mucosa do trato respiratório superior, *N. meningitidis* aderem às células epiteliais não ciliadas da nasofaringe através da interação entre as fímbrias, principalmente as do tipo IV, e receptores específicos destas células

(adesão), i.e., a proteína cofatora de membrana ou CD46, com isto pavimentam a superfície da mucosa (pavimentação), o que permite a multiplicação e a formação de micro-colônias (colonização). Nesse ponto, ocorre a secreção de IgA1 protease pela bactéria, a qual cliva a IgA1 presente na superfície da mucosa respiratória, contornando um dos primeiros mecanismos de defesa do hospedeiro, de modo que facilita o processo de adesão (Parsons *et al.*, 2004).

Apesar dos meningococos capsulados aderirem, principalmente, por meio da fímbria de tipo IV, algumas amostras isoladas da nasofaringe não possuem cápsula e fímbria como resultado da variação de fase, um indicativo da presença de adesinas alternativas. Nestas circunstâncias, a adesão é estabelecida por proteínas de classe 5 (mecanismo secundário), ou seja, as proteínas associativas de opacidade – Opa e Opc (tradução do inglês de *opacity proteins - Op*) (Figura 5). As proteínas Opa se ligam aos receptores de antígeno carcinoembriogênico (CD66), que são expressos em virtualmente todas as células humanas, com exceção dos eritrócitos. A interação com esses receptores nos fagócitos e nas células endoteliais media a fagocitose e a produção de citocinas. As proteínas Opc se ligam aos receptores proteoglicanos de heparam sulfato, o que estimula a endocitose do meningococo pelas células epiteliais e a sua passagem transversal transcelular (Corbett *et al.*, 2004). Deste modo, as bactérias são fagocitadas pelas células epiteliais não ciliadas e podem atravessar o epitélio mucoso no interior de vacúolos fagocíticos em direção à membrana basal (Stephens *et al.*, 1983). A partir de então o patógeno estimula uma resposta imune protetora ou se dissemina e produz doença. A disseminação pela corrente sanguínea ocorre a partir da invasão de pequenos vasos subepiteliais, que representa uma etapa precoce e crítica na patogênese da infecção meningocócica (Meyer, 1999).

N. meningitidis não produz exotoxinas, portanto a aptidão de sua persistência no organismo humano depende da capacidade de variação de suas estruturas de superfície (variação de fase). A bactéria usa esta propriedade, principalmente, para evadir-se do sistema imune, entretanto, a variação pode também influenciar na interação com as células do hospedeiro. Como consequência, o microrganismo pode interagir com as células epiteliais ou fagocíticas, fixar-se às células (aderência), invadi-las (invasão celular), ou permanecer protegido por uma cobertura (cápsula ou LOS contendo ácido siálico) dentro da corrente sangüínea (resistência sérica) (Meyer *et al.*, 1994; de Vries *et al.*, 1996). A invasão da corrente sangüínea por *N. meningitidis* pode resultar em bacteremia transitória, com cura espontânea, ou em progressão para doença invasiva (Figura 6). Na maioria dos casos há o desenvolvimento de septicemia antes da implantação da bactéria no SNC, a localização preferencial durante o curso da disseminação hematogênica, o que pode resultar em septicemia associada ou não à meningite.

Normalmente a bactéria é rapidamente destruída na presença de anticorpos específicos e do complemento. Entretanto, *N. meningitidis* pode sobreviver e se multiplicar na corrente sangüínea devido à presença de fatores de virulência ou a incompletude do sistema de defesa do hospedeiro. Após a invasão da corrente sangüínea, ocorre a ativação de três sistemas principais: sistema de complemento, cascata de coagulação/fibrinólise, liberação de citocinas (Emonts *et al.*, 2003). A resposta inflamatória sistêmica em pacientes com doença meningocócica tem como objetivo a neutralização do microrganismo e de seus produtos tóxicos, mas a resposta pode ser exacerbada e contribuir para lesão tecidual grave no hospedeiro (de Kleijn *et al.*, 1998).

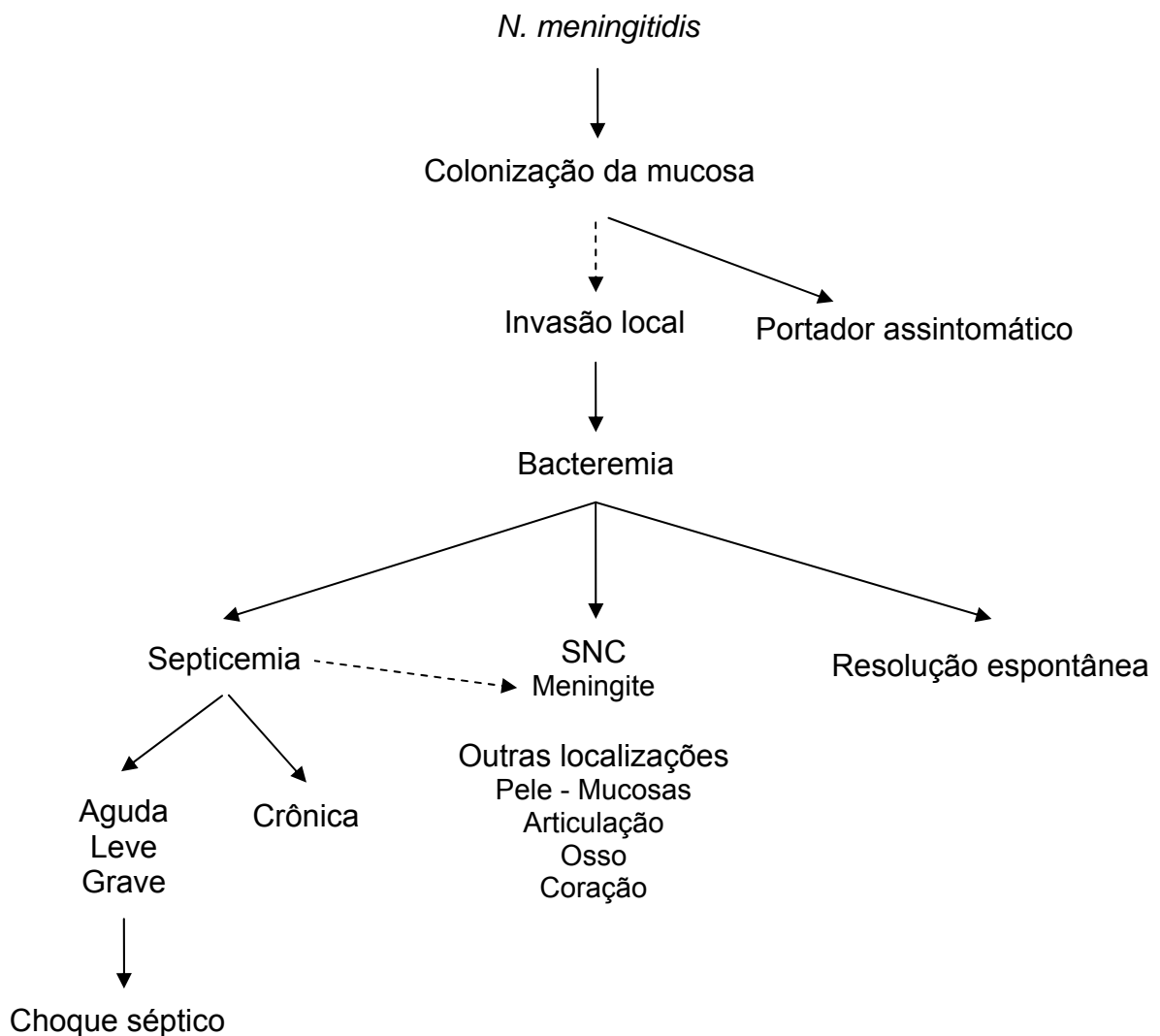


Figura 6 Diagrama do espectro clínico da infecção por *N. meningitidis*.

O fator de virulência mais importante para a sobrevivência de *N. meningitidis* na circulação sangüínea é a presença da cápsula polissacarídica, que protege o microorganismo contra lise mediada por complemento e contra fagocitose pelos neutrófilos, células de Kupffer e macrófagos esplênicos (Klein *et al.*, 1996). Essa estrutura está presente nos principais patógenos causadores de meningite precedida por bacteremia. A expressão da cápsula pode variar *in vivo* e cepas de *N. meningitidis* idênticas, definidas por tipagem genética, podem expressar diferentes polissacarídeos capsulares, em diferentes quantidades, ou não expressá-los (Swartley *et al.*, 1997; Dolan-Livengood *et al.*, 2003). Há vários mecanismos de

defesa contrários à atividade antifagocítica da cápsula bacteriana. Os mais eficientes são os anticorpos anticapsulares (opsoninas), os quais facilitam a opsonização e assegura a fagocitose pelos leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (Virji, 1996; Meyer, 1999).

Além disto, os membros patogênicos do gênero *Neisseria* desenvolveram um importante mecanismo adaptativo de aquisição de ferro, através de proteínas reguladoras ou captadoras (tradução do inglês de *ferric iron-binding protein* - *FPB*), que são expressas em condições onde a presença deste elemento é escassa, como ocorre no organismo humano, no qual virtualmente todo o ferro extracelular está ligado às proteínas (glicoproteínas quelantes). Elas consistem em duas proteínas: FbpA, que é um integrante das proteínas da membrana externa, e FbpB, que é provavelmente exposta na superfície e fixada à membrana apenas com um lipídeo. Assim a presença deste complexo protéico, parece ter importância para a invasão do organismo humano e o desenvolvimento de doença. O ferro é um elemento fundamental para o desenvolvimento bacteriano, porém o mecanismo pelo qual é captado não está totalmente elucidado. Admite-se que as proteínas funcionam como receptores que se ligam às moléculas de transferrina para utilizarem o ferro que elas contêm, dando a idéia de uma armadilha. A aquisição de ferro de outras fontes (lactoferrina ou heme) parece ser menos importante (Virji, 1996; Meyer, 1999). As proteínas fixadoras de ferro são apontadas como um importante fator de patogenicidade, além de induzirem a formação de anticorpos (Duerden, 1988).

Os lipooligossacarídeos, presentes na membrana bacteriana (íntegra ou não) e nas vesículas de membrana externa liberadas pelo meningococo (endotoxinas) durante a sua multiplicação na corrente sangüínea, também têm papel importante na fisiopatogenia da doença. As endotoxinas, e provavelmente outros

componentes, estimulam a produção de citocinas e a via alternativa do complemento. A capacidade do indivíduo de produzir citocinas induzida por endotoxinas é determinada geneticamente. Choque e altas concentrações de citocinas são encontrados particularmente em pacientes com baixos títulos de anticorpos e altas concentrações de antígeno capsulares ou endotoxinas, reforçando a importância da multiplicação da bactéria na corrente sanguínea como fator de mau prognóstico (Brandtzaeg *et al.*, 1989; van Deuren *et al.*, 1995).

O desenvolvimento de púrpura é uma das características mais marcantes da doença meningocócica (Foto 1). Essa manifestação decorre da elaboração de endotoxina, a qual desencadeia uma série de distúrbios no balanço das atividades anti e pró-coagulantes das células endoteliais. O achado histopatológico mais característico é a trombose dos vasos da derme e a necrose hemorrágica secundária. Essas características são idênticas as da reação de Schwartzman, cuja patogênese é comum (Good e Thomas, 1952). A endotoxina de *N. meningitidis* é 5 a 10 vezes mais eficaz em desencadear a reação de Schwartzman do que a de outra bactéria Gram negativa. Ademais, os níveis de endotoxina no plasma de pacientes com septicemia meningocócica estão entre os mais elevados até agora documentados, talvez justificando, pelo menos em parte, a alta incidência de púrpura em pacientes com meningococcemia comparada com a septicemia por outros microrganismos (Toews e Bass, 1974; Darmstadt, 1998). *Purpura fulminans* infecciosa ocorre apenas raramente no curso de infecção por outros microrganismos, mesmo na presença de septicemia com coagulação intravascular disseminada.



Foto 1 Exantema hemorrágico em paciente com meningococemia (ilustração da autora)

O choque, um sinal presente nos casos mais graves, em geral acompanhados de exantema hemorrágico, é causado por alteração da permeabilidade capilar, diminuição da resistência vascular periférica, microtrombose vascular e disfunção miocárdica. A endotoxina tem um papel central no desencadeamento destas alterações (Caputo *et al.*, 1992), e a gravidade do choque se correlaciona com o grau de endotoxemia (Brandtzaeg *et al.*, 1989; van Deuren *et al.*, 1995). A chance de sobrevivência de um paciente com choque é de 75% quando na admissão a concentração sérica de endotoxina está na faixa de 10 a 50 unidades de endotoxina por ml (UE/ml), enquanto que esta chance cai para 15% para aqueles com concentrações entre 50 e 250 UE/ml, e nenhuma chance para aqueles com concentrações acima de 250 UE/ml (Stephens *et al.*, 2007). Os níveis de endotoxina plasmática tendem a cair progressivamente após a primeira dose de antibiótico, com uma redução de 50% dentro de 2 horas, assim como a concentração sérica das citocinas. Já o sistema de complemento se mantém ativado por um período de 12 a 24 horas (Berkowitz *et al.*, 1983).

Para que haja o desenvolvimento de meningite a bactéria precisa atravessar a barreira hematoencefálica, que tem a função de manter a homeostasia do SNC. A

invasão das meninges ocorre como consequência da invasão primária da corrente sanguínea. Os mecanismos relacionados ao tropismo do meningococo pelas meninges e a sua passagem pela barreira hematoencefálica não estão plenamente estabelecidos. Admite-se que *N. meningitidis* atravessa o endotélio da barreira hematoencefálica, provavelmente, através do plexo coróide do ventrículo lateral, para alcançar o espaço subaracnóideo. Para atravessar esta barreira protetora do cérebro, os patógenos extracelulares devem cruzar a monocamada da junção das células epiteliais ou endoteliais. O número limitado de patógenos capazes de invadir as meninges sugere a necessidade de atributos específicos. Para *N. meningitidis* a fímbria tipo IV foi identificada como um fator essencial para a invasão das meninges, entretanto outros fatores ainda não conhecidos também devem ser importantes.

No espaço subaracnóideo, onde os principais mecanismos de defesa humorais e celulares estão ausentes, a bactéria pode se multiplicar livremente no LCE. A liberação de endotoxina deflagra uma ativação compartimentalizada (confinada ao espaço subaracnóideo) de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral - TNF, IL-1, IL-6, IL-8, óxido nítrico, fator estimulante de colônias de monócitos e fator ativador de plaquetas) e antiinflamatórias (IL-1Ra, IL-10, IL-2, TNFsR-p55, TNFsR-p75 e IL-1Rs tipo II). O TNF e a IL-1 aumentam a permeabilidade da barreira hematoencefálica e promovem o fluxo de neutrófilos através desta, acarretando um quadro de meningite supurativa, típico das etiologias bacterianas. A liberação dos produtos dos neutrófilos contribui para o agravamento da lesão tecidual (van Deuren *et al.*, 2000).

A primeira linha de defesa do organismo contra a infecção por *N. meningitidis* é a mucosa do trato respiratório superior. Fatores que interferem com a integridade da mucosa, como infecção viral, tabagismo e baixa umidade do ar,

predispõem à doença meningocócica (Verheul *et al.*, 1993). Após a invasão por *N. meningitidis*, a defesa do hospedeiro é determinada pela resposta humoral e celular do sistema imune inato e adaptativo. Anticorpos específicos conferem proteção completa, porém a defesa inicial em indivíduos susceptíveis é dependente primariamente de elementos da resposta imunológica inata. A base fundamental da defesa inata precoce é a bacteriólise mediada por complemento e a opsonofagocitose. A ativação do sistema de complemento, inicialmente, em indivíduos sem anticorpos específicos contra a bactéria invasiva, ocorre através da via lecitina fixadora de manose (tradução do inglês de *mannose-binding lectin - MBL*) e da via alternativa, que independem da presença de anticorpos específicos. A MBL é uma proteína sérica sintetizada no fígado, que tem uma importante função na imunidade inata do hospedeiro, pela sua ligação a resíduos de manose (ou a outros carboidratos) e a lipopolissacarídeos presentes nos microorganismos (Kuipers *et al.*, 2003; Turner, 2003). Podem ainda intermediar a fagocitose por macrófagos, ao ligarem-se aos lipopolissacarídeos da membrana celular da bactéria (Fraser *et al.*, 1998; Kuipers *et al.*, 2003). A ativação do complemento contribui para a fagocitose da bactéria e induz a resposta inflamatória pela via C3a e C5a.

Variações genéticas do hospedeiro que resultam em alterações dos componentes do sistema de complemento, da cascata de coagulação/fibrinólise e da resposta inflamatória mediada por citocinas podem afetar a susceptibilidade, a gravidade e o prognóstico da doença meningocócica (Emonts *et al.*, 2003). Alguns polimorfismos genéticos que resultam em redução sérica da MBL predispõem à doença meningocócica invasiva, assim como outras infecções bacterianas (Bax *et al.*, 1999; Hibberd *et al.*, 1999). Defeitos da via alternativa do sistema de complemento, como a deficiência de properdina, além de aumentarem a

susceptibilidade do indivíduo à doença invasiva, podem desencadear doença fulminante (Sjoholm *et al.*, 1988; Fijen *et al.*, 1995). A deficiência em um dos componentes terminais do complemento aumenta, de forma única, em até 6000 vezes, a chance de doença meningocócica recorrente, inclusive por sorogrupos infreqüentes (Ross e Densen, 1984; Fijen *et al.*, 1989; Fijen *et al.*, 1994). A deficiência de proteína C, uma proteína envolvida nos sistemas de coagulação, anticoagulação e fibrinolítico, está implicada na coagulação intravascular disseminada extensa e necrose dos tecidos, o que pode aumentar a chance de uma evolução fatal ou mutilações (Fijen *et al.*, 1995).

A relevância das deficiências da imunidade celular ainda não é bem estabelecida na susceptibilidade à doença meningocócica. Não existe nenhuma correlação definida entre fenótipo HLA (antígenos leucocitários humanos) e uma maior susceptibilidade à infecção invasiva por *N. meningitidis* (Kristiansen e Thorsby, 1980). Outro comprometimento da imunidade celular, a síndrome da imunodeficiência humana adquirida não é reconhecida como fator de risco para a doença meningocócica, embora alguns casos em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) já tenham sido descritos (Stephens *et al.*, 1995).

2.2.3 Diagnóstico clínico

A doença meningocócica é uma das principais emergências médicas. O reconhecimento precoce da doença e o início imediato do tratamento é absolutamente essencial para o sucesso terapêutico, com reconhecida redução da letalidade, principalmente nos pacientes com manifestações cutâneas (Toews e Bass, 1974; Cartwright *et al.*, 1992; Hart e Rogers, 1993). O diagnóstico inicial de

doença meningocócica é fundamentalmente clínico, sendo o exantema e/ou o enantema hemorrágico os principais indicativos de uma etiologia meningocócica. O diagnóstico na fase precoce da doença pode ser bastante difícil, e em geral, requer um alto grau de suspeição pelo médico. A dificuldade inicial se deve, em parte, ao fato de que as manifestações clássicas (exantema hemorrágico, sinais de irritação meníngea e diminuição do nível de consciência) podem não estar presentes na primeira avaliação médica, as quais se desenvolvem algumas horas (6-12 horas) após o início dos sintomas (Thompson *et al.*, 2006). O diagnóstico clínico precoce das doenças febris agudas é sempre um desafio, mesmo em locais com recursos adequados, pois inicialmente as manifestações são comuns a várias doenças, independente da gravidade. Neste contexto, a elaboração das hipóteses diagnósticas depende da identificação de “elementos de convicção” - expressão cunhada pelo Professor Fernando Martins, que na maioria das vezes podem ser obtidos através da anamnese e do exame físico minucioso. A descrição clínica das doenças, conforme documentado nos livros técnicos, em geral resumem os principais sinais e sintomas que podem ocorrer durante a evolução, mas que não necessariamente vão estar presentes em todas as pessoas acometidas.

Em todo quadro febril agudo, o imprescindível é reconhecer os casos graves ou potencialmente graves, as doenças com tratamento específico e/ou com risco de transmissão para outros indivíduos. Mesmo que sinais de gravidade não estejam presentes na avaliação inicial, o paciente deve ser orientado a retornar para reavaliação médica caso apresente piora ou persistência do quadro. Portanto, para não incorrer em erros graves, é fundamental que o atendimento do paciente com febre seja sistematizado, visando a coleta da história clínica e epidemiológica de forma objetiva. O exame físico deve ser direcionado para a pesquisa de sinais de

gravidade e para manifestações que possam contribuir para corroborar ou afastar as principais hipóteses diagnósticas elaboradas a partir da história. A solicitação de exames complementares deve ter um objetivo e ser capaz de resultar em uma consequência.

A infecção por *N. meningitidis* produz uma grande variedade de manifestações clínicas e freqüentemente é precedida por um quadro de infecção do trato respiratório superior (dor de garganta e coriza). A apresentação mais comum é a meningite, geralmente acompanhada de septicemia (meningococemia). A distinção entre a meningite e a meningococemia é fundamental, pois a fisiopatogenia e o manejo clínico são distintos (Tarlow e Geddes, 1992). A meningite meningocócica é uma infecção do sistema nervoso central, com alterações características no LCE. Na meningite meningocócica isolada, as alterações patogênicas estão restritas ao sistema nervoso central e a letalidade fica em torno de 5% ou menos. Em cerca de 50-70%, a meningite meningocócica está associada ao exantema hemorrágico, o que indica a ocorrência concomitante de septicemia (Kirsch *et al.*, 1996). As lesões hemorrágicas (púrpura) são classificadas em petéquias ($\varnothing < 3$ mm) ou manchas equimóticas ($\varnothing \geq 3$ mm). A meningococemia, por outro lado, é uma doença sistêmica grave, com alterações patogênicas disseminadas pelo organismo. A letalidade é de 15% ou mais, podendo chegar a 80% em pacientes com choque. De acordo com a evolução clínica, a meningococemia pode ser classificada em leve, grave ou crônica. Ao longo dos anos, vem sendo observada uma tendência de aumento das formas septicêmicas isoladas. Pollard *et al.* (1999) mostraram que cerca de 7-10% dos casos se apresentavam como meningococemia, 40% como meningite associada à meningococemia e o restante como meningite. Já em 2006, Kaplan *et al.*

observaram que 27% da população incluída no seu estudo tinham meningococcemia isolada.

Ocasionalmente, a doença pode se manifestar como bacteremia oculta, pneumonia primária, faringite, conjuntivite, infecção do trato genital ou proctite (Greenwood, 1991). *N. meningitidis* é responsável por até 1 a 5% dos casos de bacteremia oculta em crianças com febre alta, sem manifestações de toxemia (Shapiro *et al.*, 1986; Baraff e Lee, 1992). Apesar da recuperação clínica sem terapia antimicrobiana específica já ter sido documentada (Sullivan e LaScolea, 1987), o risco de desenvolvimento de meningite em crianças com bacteremia oculta pode chegar a até 58% (Baraff e Lee, 1992). Pneumonia por *N. meningitidis* ocorre em 5 a 15% dos pacientes com doença meningocócica invasiva (Racoosin *et al.*, 1998).

As manifestações clássicas da doença meningocócica invasiva (exantema hemorrágico, sinais de irritação meníngea e diminuição do nível de consciência), quando presentes, surgem em média 13 a 22 horas após o início do quadro. No estudo realizado por Thompson *et al.*, o exantema hemorrágico, a manifestação clássica mais freqüente, foi descrito em apenas 42-70% dos casos e surgiu em média 13 horas após o início do quadro febril agudo. Sinais de irritação meníngea surgiram, em média, 15 horas após o início das manifestações, e foram observados com maior freqüência em crianças acima de 5 anos (46-53%). Apenas 7-15% dos pacientes tinham diminuição do nível de consciência no momento da admissão hospitalar (em média, 19 horas de evolução).

O exantema hemorrágico, freqüentemente, surge nos tornozelos, nos punhos e nas axilas, com posterior disseminação para os membros, cabeça e tronco (Boslego, 1992). Na admissão, pode haver apenas enantema, com a presença de petéquias nas conjuntivas ou palato. O número de lesões cutâneas pode aumentar

dramaticamente em poucas horas e o exantema pode continuar progredindo até 24 horas após o início da terapia antimicrobiana adequada, da mesma forma que as lesões iniciais podem aumentar de tamanho (Foto 1) (Salzman e Rubin, 1996). As manchas equimóticas podem progredir a partir de pequenas máculas ou pápulas (Kingston e Mackey, 1986). Embora a púrpura seja a apresentação mais comum das manifestações cutâneas, em até 13% o exantema pode ser macular ou máculo-papular (Foto 2) (Kirsch *et al.*, 1996; Riordan *et al.*, 1996).



Foto 2 Exantema máculo-papular em paciente com meningococemia (ilustração da autora).

A apresentação clínica da meningite meningocócica – febre, cefaléia intensa, vômitos, fotofobia e sinais de irritação meníngea – é indistinguível clinicamente de outras causas de meningites bacterianas ou virais. Em uma série de casos de 696 pacientes com meningite bacteriana, descrita em 2004 por van de Beek, apenas 44% dos pacientes tinham a tríade clássica de febre, rigidez de nuca e diminuição do nível de consciência. Entretanto, 95% dos pacientes apresentavam pelo menos duas das quatro manifestações clínicas principais: rigidez de nuca, febre, cefaléia e alteração do nível de consciência. Em outro estudo, envolvendo 493 casos de meningite em adultos, a tríade (febre, rigidez de nuca e diminuição do nível de

consciência) foi encontrada em apenas 2/3 dos pacientes, mas todos tinham pelo menos uma das três manifestações (Durand *et al.*, 1993). Nos lactentes pode haver apenas febre, abaulamento da fontanela, irritabilidade e recusa alimentar. Rigidez de nuca é pouco observada nesta faixa etária. Quando o quadro tem início marcado por febre e convulsão pode, equivocadamente, ser associado à crise convulsiva febril e retardar o diagnóstico de meningite (Barroso *et al.*, 1998). A rigidez de nuca é causada pela irritação meníngea que provoca a resistência à flexão passiva do pescoço. Embora este achado clínico seja clássico de meningite, está presente em apenas 30% dos casos (Ziai e Lewin, 2006). Os sinais de Kernig e Brudzinski também são característicos de meningite, mas possuem uma sensibilidade ainda menor (em torno de 5%), mesmo nos adultos (Thomas *et al.*, 2002).

A septicemia meningocócica pode ser dividida em aguda – leve ou grave – e crônica, tendo como base a evolução clínica (Figura 6). A meningococemia leve apresenta lesões cutâneas múltiplas de vasculite, sem a presença de colapso cardiovascular (choque). A presença de choque caracteriza a meningococemia grave e quando acompanhada por uma evolução de poucas horas (6h-12h) é definida como fulminante, com a morte ocorrendo em torno de 12h após o seu início, muitas das vezes independente do tratamento. As manifestações clínicas mais comuns da meningococemia são febre associada a exantema hemorrágico, irritabilidade, perda do apetite, astenia, mialgia, náuseas, vômitos e cefaléia. A febre, em geral, é alta e tem início abrupto. A mialgia ocasionalmente é muito intensa e pode ser um parâmetro diferencial importante. Sinais de gastroenterite ou faringite, sem exudato, costumam preceder o quadro de meningococemia. A piora clínica pode ser muito rápida, em geral em poucas horas. O paciente informa, com freqüência, que nunca se sentiu tão doente, e pode expressar sensação de morte

iminente. Em um estudo retrospectivo realizado por Thompson *et al.* (2006), dor em membros inferiores, extremidades frias, sede (em crianças maiores) e pele mosqueada (rendilhado violáceo) foram as manifestações clínicas mais precoces de septicemia em pacientes com doença meningocócica. Estas alterações geralmente ocorrem nas primeiras 12 horas, em média de 8 horas, e podem já estar presente na primeira avaliação médica.

A meningococemia pode progredir para o choque cardiovascular de forma súbita, mesmo após o início do tratamento. O choque é multifatorial e resulta de hipovolemia causada por aumento da permeabilidade capilar, disfunção miocárdica, alteração do tônus vasomotor e disfunção do metabolismo celular (Mercier *et al.*, 1988). O aumento da permeabilidade capilar promove a perda de água e proteínas plasmáticas para os espaços extravasculares. Da mesma forma, ocorre a perda de proteínas pela urina, resultando em uma albuminúria equivalente àquela encontrada na síndrome nefrótica (Oragui *et al.*, 2000). As manifestações clínicas do choque surgem devido ao mecanismo compensatório do organismo de tentar manter a perfusão de órgãos vitais a expensas da perfusão periférica e de outros órgãos (não vitais). Na fase inicial do choque, processos compensatórios fisiológicos (taquicardia, diminuição da perfusão renal e da pele) mantêm o volume circulante e conseqüentemente o débito cardíaco. Desta forma, a função cerebral pode estar mantida, apesar da hipotensão, o que pode levar ao médico a subestimar o grau de colapso circulatório. As crianças são capazes de compensar a perda de até 40% do volume circulatório sem desenvolver hipotensão; assim as crianças podem ter pressão arterial normal até fases mais avançadas do choque (Pollard e Nadel, 2006). A taquipnéia reflete o desenvolvimento de hipóxia tecidual e acidose metabólica e, com a progressão do choque, a hipóxia é agravada pela diminuição da

perfusão pulmonar e do edema pulmonar.

Meningococemia fulminante ou *purpura fulminans*, que ocorre em 5 a 10% dos casos de doença meningocócica, tem como característica clínica principal o choque séptico associado à disseminação rápida das lesões cutâneas hemorrágicas (Gold, 1987). É caracterizada pelo seu início abrupto, rapidamente progressivo, com disseminação das hemorragias cutâneas, por todo o tegumento, associada à necrose das extremidades – necrose distal simétrica (Foto 3) – devido à trombose vascular e coagulopatia intravascular disseminada. Inicialmente, as lesões cutâneas podem apresentar aspecto maculo-papular, algumas vezes dolorosas. Posteriormente, evoluem para petéquias e equimoses (Foto 1), estas últimas com limites irregulares – geográficos –, com bordas bem delimitadas, com tendência a coalescência, mesmo após o início do tratamento. Necrose gangrenosa pode se estender ao tecido subcutâneo e, ocasionalmente, acometer músculos e ossos. A letalidade pode chegar a 80%.



Foto 3 Petéquias e manchas equimóticas múltiplas em paciente com *purpura fulminans* por *N. meningitidis* do sorogrupo B. Presença de necrose distal simétrica nos membros superiores (ilustração do Dr. David E. Barroso).

Em geral, a procura da assistência médica e a suspeição diagnóstica da doença meningocócica pelo médico estão temporalmente relacionadas com o aparecimento do exantema hemorrágico, que como ficou demonstrado no trabalho do Thompson *et al.* surge, em média, 5 horas após as primeiras manifestações de septicemia e nem sempre estão presentes. Certamente, ainda são necessários outros estudos para avaliação destas manifestações iniciais (dor em membros inferiores, extremidades frias e alteração da coloração da pele) em outras doenças febris agudas, mas este é o primeiro estudo voltado para identificação de sinais e sintomas que antecedem as manifestações clássicas, o que poderá contribuir de forma significativa para redução da letalidade, que vem se mantendo muito elevada ao longo dos anos, apesar de toda evolução no esclarecimento da fisiopatogenia da doença e no avanço nas medidas terapêuticas.

Algumas escalas de prognóstico para doença meningocócica, baseadas em critérios clínicos e laboratoriais, são utilizadas para se tentar definir o grupo de pacientes com maior risco de óbito. A escala mais utilizada é a de Glasgow para septicemia meningocócica (tradução do inglês de *Glasgow Meningococcal Septicaemia Prognostic Score - GMPS*), que é simples de ser realizada, reprodutível e identifica rapidamente crianças com doença meningocócica fulminante (Sinclair *et al.*, 1987). A escala vai de zero a 15 pontos e inclui as seguintes variáveis: presença de hipotensão, diferença entre temperatura axilar e retal $> 3^{\circ}\text{C}$, déficit de base > 8 mmol/l, escala de coma (Simpson & Reilly) < 8 ou piora ≥ 3 pontos em uma hora, ausência de sinais de irritação meníngea, piora clínica nas últimas horas (informação obtida com os pais ou enfermeiros), exantema hemorrágico difuso ou progressivo. A média da pontuação dos sobreviventes é de 3 e dos que evoluem para óbito é de 8. Em um estudo realizado em São Paulo, a pontuação na escala de Glasgow ≥ 8 foi

significativamente associada com óbito com um valor preditivo positivo de 70% e especificidade de 92,5% (Silva *et al.*, 2001).

A meningococemia crônica é uma forma de apresentação da doença meningocócica raramente diagnosticada nos dias de hoje. Comparando os relatos da literatura do início do século XX com os atuais é possível perceber uma redução da frequência das formas clínicas com evolução crônica, certamente em consequência do advento da antibioticoterapia. A maioria dos casos relatados é em adultos, apenas 10% em indivíduos com menos de 18 anos de idade. O quadro clínico é caracterizado por febre recorrente, associada a artralgias migratórias, artrite e exantema hemorrágico. Em crianças, a meningococemia crônica eventualmente evolui com resolução espontânea sem tratamento específico. Em crianças cerca de 10-15% dos casos apresentam complicações, enquanto que em adultos até 40% evoluem com agravamento da meningococemia, ou meningite, endocardite, nefrite, epididimite e complicações oculares (Ploysangam e Sheth, 1996).

2.2.4 Diagnóstico diferencial

A infecção invasiva por *N. meningitidis* resulta em meningite em cerca de 70% dos casos (Kaplan *et al.*, 2006), com ou sem septicemia, o que torna imprescindível o diagnóstico diferencial com todas as etiologias de meningite aguda e febres hemorrágicas, particularmente aquelas que cursam com envolvimento do SNC. Aproximadamente 50-70% dos casos de meningite meningocócica desenvolvem exantema hemorrágico (Kirsch *et al.*, 1996). A identificação do agente etiológico da meningite e da septicemia com púrpura é importante para a definição da conduta terapêutica e essencial para adoção de medidas preventivas para os

contactantes. Em todos os pacientes com febre e exantema hemorrágico, deve ser fortemente considerada a possibilidade de doença meningocócica, pelo seu alto potencial de progressão rápida e fatal. Outras infecções podem causar estas manifestações, inclusive doenças virais com diferentes graus de gravidade, porém com uma evolução menos abrupta e o desenvolvimento de exantema hemorrágico mais tardio.

A maioria das crianças com febre e petéquias tem doença viral, mas 2-15% têm doença meningocócica (Van Nguyen *et al.*, 1984; Baker *et al.*, 1989; Mandl *et al.*, 1997). A presença de petéquias exclusivamente acima da linha mamilar está fortemente relacionada à doença viral. Pacientes com doenças bacterianas invasivas têm uma maior probabilidade de terem petéquias nos membros inferiores (Baker *et al.*, 1989). Em um estudo prospectivo realizado por Nielsen e cols. (2001), 15% dos pacientes (faixa etária de um mês a 16 anos) com febre e exantema hemorrágico tinham doença meningocócica, 2% outra doença bacteriana invasiva, 7% infecção por enterovírus e 4% por adenovírus. Cerca de 72% não tiveram o diagnóstico etiológico estabelecido nesse estudo. Cinco variáveis clínicas foram relacionadas à doença meningocócica: (1) aspecto do exantema sugestivo (2) distribuição disseminada das lesões cutâneas; (3) diâmetro > 2 mm em pelo menos uma lesão hemorrágica; (4) estado geral comprometido (escala de observação padronizada); (5) rigidez de nuca. Na presença de duas ou mais variáveis clínicas descritas acima, a probabilidade de identificar um paciente com doença meningocócica foi de 97% e a taxa de falso positivo foi de 12% (Nielsen *et al.*, 2001).

Purpura fulminans ocorre basicamente em três situações clínicas: (i) período neonatal como uma manifestação de homozigose da proteína C, ou raramente, deficiência de proteína S; (ii) aproximadamente sete a dez dias após quadro

infeccioso benigno, como varicela ou escarlatina (*purpura fulminans* idiopática); (iii) e em associação com doença infecciosa aguda, especialmente septicemia com liberação de endotoxinas (lipooligossacarídeos) (Darmstadt, 1998). *Purpura fulminans* que ocorre em até 15-25% dos pacientes com meningococemia, raramente está associada a infecção por outros agentes (Wong *et al.*, 1989). Entretanto, em uma série de casos de pacientes com septicemia pneumocócica, até 6% desenvolveram gangrena periférica simétrica (Johansen e Hansen, 1993).

A história clínica e epidemiológica e o exame físico são fundamentais para o estabelecimento das hipóteses diagnósticas. Tempo de evolução da doença, exantema hemorrágico, presença de meningite e fatores predisponentes (imunodeficiências congênitas ou adquiridas, defeitos anatômicos do SNC, asplenia) são elementos importantes que auxiliam no diagnóstico diferencial. As principais possibilidades diagnósticas devem variar de acordo com cada população estudada (faixa etária, população urbana ou rural, história de viagens). Na população do Rio de Janeiro, *N. meningitidis* é a principal causa de meningite bacteriana e septicemia comunitária, freqüentemente (60-70%) associada com exantema hemorrágico (Barroso, 1998). Diante de um paciente com meningite ou febre com exantema hemorrágico, deve-se sempre considerar a possibilidade de doença meningocócica. Atualmente, os principais diagnósticos diferenciais incluem outras causas de meningite ou encefalite, etiologias de septicemia comunitária, infecções virais e riquetsioses.

2.2.4.1 Meningites agudas

2.2.4.1.1 Meningites bacterianas

Clinicamente não é possível distinguir a meningite causada por *N. meningitidis* de outras etiologias bacterianas. Um aspecto chave para o diagnóstico é o exantema hemorrágico e o seu tempo de aparecimento. Porém, cerca de 30-40% dos casos de meningite meningocócica não apresentam um exantema sugestivo, além de outras etiologias comuns de meningite bacteriana, como *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, em cerca de 1-2% dos casos, evoluírem com púrpura, de aspecto indistinguível da doença meningocócica (Jonsson e Alvin, 1971; Geiseler *et al.*, 1980). A ocorrência de meningite bacteriana como complicação supurativa de infecção invasiva é variável de acordo com o agente bacteriano envolvido, sendo mais freqüente nas infecções por *N. meningitidis*, seguida por *H. influenzae* e por *S. pneumoniae*. Em um estudo realizado por Schuchat e cols. (1997), a meningite bacteriana ocorreu como complicação supurativa em cerca de 48% dos pacientes com infecção invasiva por *N. meningitidis*, comparado com 10% daqueles com infecção invasiva por *H. influenzae* e 4% por *S. pneumoniae*.

A doença invasiva por *S. pneumoniae* é mais freqüente nos extremos da vida, sendo sua incidência maior em crianças abaixo de 2 anos e adultos acima de 65 anos. Nos primeiros meses de vida a maioria dos lactentes está relativamente protegida devido à imunidade conferida pela passagem de anticorpos maternos através da placenta. A meningite por *S. pneumoniae* é a que apresenta maiores taxas de morbidade e letalidade, quando comparada com aquelas causadas por *H. influenzae* e por *N. meningitidis*. As taxas de seqüelas neurológicas variam entre 30

a 41%, com letalidade entre 15 a 30% (Ostergaard *et al.*, 2005; Weisfelt *et al.*, 2006).

A doença invasiva por *H.influenzae* tipo b, o exemplo mais marcante de doença da infância, com mais de 90% dos casos ocorrendo em menores de 5 anos, vem se tornando cada vez mais rara em países onde a vacinação dos lactentes foi adotada de rotina. Assim, os casos que têm sido notificados são em crianças não vacinadas, adolescentes ou adultos. A letalidade é de 3 a 6% e taxa de seqüelas neurológicas varia entre 15 e 30% (Tunkel e Scheld, 2005). O diagnóstico de meningite por *H.influenzae* em crianças acima de 6 anos e em adultos sugere a presença de alguma condição de base, como sinusite, otite média, pneumonia, diabetes mellitus, alcoolismo, esplenectomia funcional ou anatômica, fístula liquórica e imunodeficiência (e.g. hipogamaglobulinemia) (Farley *et al.*, 1992).

Outras etiologias bacterianas de meningite são mais freqüentes em neonatos - em geral associadas à septicemia, em indivíduos com deficiências imunológicas, com defeitos congênitos - como sinus dérmico occipital ou lombar (i.e., fístula epitelial que se estende da pele para tecidos mais profundos com possibilidade de comunicação com o espaço subdural), ou com derivações intraventriculares (Greenwood, 2000). As causas mais freqüentes de meningite neonatal são *Streptococcus agalactiae* (grupo B de Lancifield), *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, seguidas por outras enterobactérias, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus* do grupo A. Meningite bacteriana aguda ocorre em até 15% dos neonatos com bacteremia. Os fatores de risco relacionados à septicemia neonatal e meningite incluem baixo peso ao nascer (< 2500g), ruptura prematura das membranas uterinas, parto traumático ou infectado, hipóxia fetal, infecção materna periparto, galactosemia e alterações do trato urinário do recém-nascido. Em pessoas com mais de 50 anos, a possibilidade de meningite por *L.*

monocytogenes e, numa menor extensão, enterobactérias deve ser sempre considerada, pois estes agentes são responsáveis por até 20% dos casos nesta faixa (Lorber, 2007).

Os métodos laboratoriais tradicionais utilizados para o diagnóstico etiológico da meningite bacteriana (bacterioscopia pelo método de Gram, cultura e teste do látex) são capazes de identificar os principais agentes bacterianos. Entretanto a sensibilidade desses métodos é limitada, apresentam variação da sensibilidade de acordo com o tipo de microorganismo, além de sofrerem interferência da utilização de antibiótico antes da coleta dos espécimes clínicos.

A sensibilidade da bacterioscopia pelo método de Gram varia entre 60 e 90%, e a especificidade varia entre 97 e 100%, na ausência de antibioticoterapia prévia. A sensibilidade do Gram depende diretamente da concentração de bactérias no LCE o do microorganismo envolvido; concentrações iguais ou menores que 10^3 UFC/ml estão associadas com uma positividade do Gram de apenas 25%, enquanto concentrações iguais ou maiores que 10^5 têm uma positividade maior que 90%. A sensibilidade do Gram é maior para o *S. pneumoniae* (90%), comparada com *H. influenzae* (86%), *N. meningitidis* (75%), bastonetes Gram negativos (50%) e *L. monocytogenes* (< 50%) (Gray e Fedorko, 1992; Saez-Llorens e McCracken, 2003).

A sensibilidade da cultura de LCE em pacientes com meningite é de 70 a 85%, com especificidade de 100%. O exame, no entanto, é afetado por uma série de fatores como uso prévio de antibióticos, condições inadequadas de armazenamento (amostras refrigeradas ou congeladas) e transporte (tempo entre coleta e semeadura maior que 2h), aumento do pH da amostra após a coleta e qualidade do meio de cultura (Cunniffe *et al.*, 1996; Tunkel, 2005).

A detecção de antígenos bacterianos no LCE é utilizada de rotina para *S.*

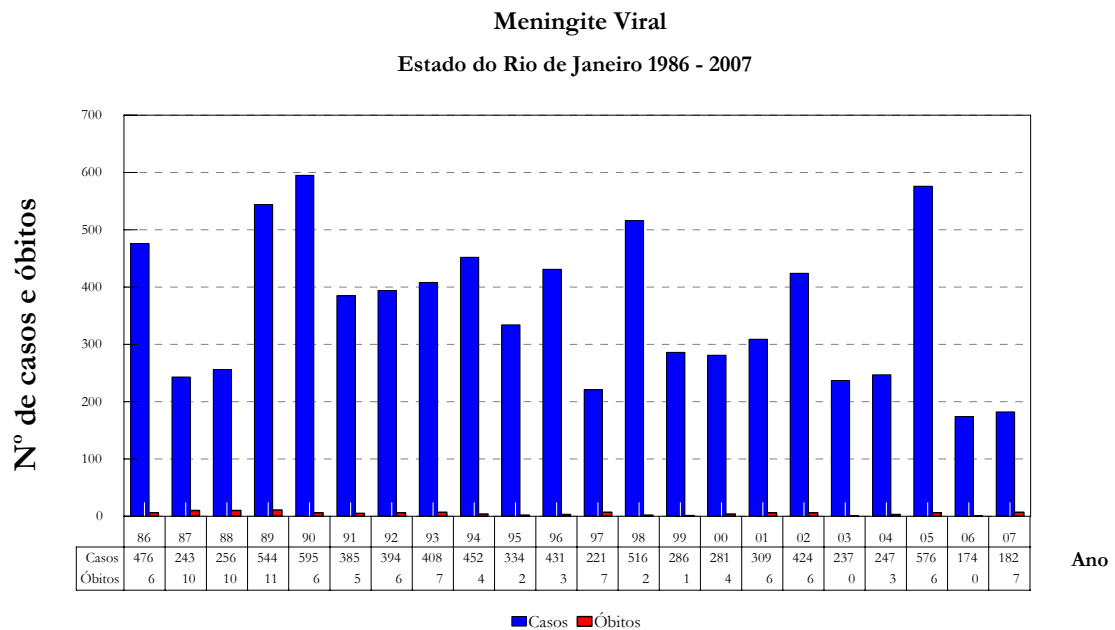
pneumoniae, *H. influenzae*, *N. meningitidis* e *Streptococcus* do grupo B. A sensibilidade do método varia de acordo com o fabricante e pode sofrer interferência do aumento do pH que ocorre logo após a obtenção da amostra de LCE (Cunniffe *et al.*, 1996). A sensibilidade descrita na literatura varia de 81-100% para *S. pneumoniae*, de 82-94% para *H. influenzae*, 55-74% para *N. meningitidis* e 55-74% para *Streptococcus* do grupo B; com especificidade variando de 88-100% (Gray e Fedorko, 1992). A utilização do teste do látex de rotina tem alto custo, e é questionável, pois parece não aumentar de forma significativa o número de casos confirmados de meningite, principalmente naqueles com cultura negativa (Tarafdar *et al.*, 2001; Nigrovic *et al.*, 2004).

O ensaio de PCR para o diagnóstico de agentes infecciosos vem sendo utilizado, com sucesso, em diversos países. A técnica já foi descrita para o diagnóstico das meningites bacterianas, empregando iniciadores universais, ou de uma etiologia específica, através da utilização de iniciadores espécie-específicos (Saravolatz *et al.*, 2003; Tzanakaki *et al.*, 2005). A sensibilidade do multiplex PCR convencional para o diagnóstico *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, as três principais causas de meningite bacteriana aguda, é de 93.9%, 92.3% and 88%, respectivamente; a especificidade é de 100% (Tzanakaki *et al.*, 2005).

2.2.4.1.2 Meningites virais

O termo meningite asséptica apresenta um sentido bastante amplo, que na verdade pode incluir qualquer caso de meningite (infecciosa ou não) para o qual uma etiologia não foi estabelecida pelos métodos de diagnóstico laboratorial. Os vírus são a principal causa de meningite a líquido claro, uma classificação de

meningite asséptica definida por uma pleocitose moderada (≤ 500 céls/mm³), em geral, com predomínio de células mononucleares. Os enterovírus são a principal causa de meningite a líquido claro, correspondendo a cerca de 80-92% dos casos diagnosticados (Rotbart, 1995). Os vírus representam a segunda principal etiologia de meningite aguda (Gráfico 7).



GEDMIR-Meningites/SESDEC/SES-RJ

Gráfico 7 Série histórica dos casos e óbitos de meningite viral no Estado do Rio de Janeiro.

Enterovírus

Os seres humanos são os únicos reservatórios dos enterovírus na natureza e a principal via de transmissão é através da contaminação oral-fecal e secreção oral ou respiratória. Existem mais de 70 sorotipos diferentes de enterovírus humanos que são classificados em: *Echovirus* (34 sorotipos), *Coxsackievirus A* (24 sorotipos), *Coxsackievirus B* (6 sorotipos), *Enterovirus 68–72* (5 sorotipos) e *Poliovirus* (3 sorotipos). Em países de clima temperado, a transmissão tem um padrão sazonal marcante, com predomínio no verão, relacionada principalmente a atividades

aquáticas. Já em países tropicais e subtropicais, a incidência é alta durante todo o ano (Begier *et al.*, 2008).

A infecção por enterovírus pode ocorrer em todas as faixas etárias, mas é mais comum em crianças pequenas, especialmente de 1 a 4 anos de idade. Na maioria das vezes, os enterovírus causam doença febril aguda, sem sinais de gravidade. Entretanto podem causar meningite asséptica, encefalite, conjuntivite hemorrágica aguda, paralisia e falência de múltiplos órgãos (Grist *et al.*, 1978). *Echovirus* (especialmente sorotipo 30) e *Coxsackievirus* (especialmente grupo B) causam mais de 90% dos casos de meningite virais (Dagan *et al.*, 1988). Todas as faixas etárias são susceptíveis, mas a maioria dos casos de meningite ocorre em menores de 12 meses (Rorabaugh *et al.*, 1993). Exantema hemorrágico já foi descrito com infecções causadas pelo *Echovirus* 9 (Frothingham, 1958; Sabin *et al.*, 1958) e pelo coxsackievírus A9, dificultando o diagnóstico diferencial com doença meningocócica, especialmente quando ocorre simultaneamente meningite asséptica.

Os sorotipos 22 e 23 de *Echovirus* foram reclassificados, em 2000, em um novo gênero - *Parechovirus* - e designados de parechovírus humanos (HPeV) tipo 1 e 2, respectivamente. HPeV é um patógeno de distribuição universal que afeta principalmente crianças. Mais recentemente, novos tipos (3 - 6) de HPeV foram identificados como causa de doença humana no Japão, Holanda e Estados Unidos. HPeV3 tem sido associado com doença mais grave, como septicemia neonatal e meningite. Envolvimento do sistema nervoso central, como encefalite e paralisia, também já foi descrito em doentes com infecção por HPeV1, mas em menor frequência (Wolthers *et al.*, 2008).

Não é possível estabelecer o diagnóstico diferencial entre meningites

bacterianas e virais sem a realização da análise do LCE. Em geral, a meningite viral não altera o aspecto do LCE, com um aumento da celularidade, na maioria das vezes, entre 5 a 100 céls/mm³; excepcionalmente pode chegar a > 1.000 céls/mm³ (Wenner *et al.*, 1981; Amir *et al.*, 1991). O predomínio de células no LCE é de linfócitos ou monócitos (> 50%), mas pode-se observar um predomínio de neutrófilos nas primeiras horas após a invasão do agente viral no espaço subaracnóideo, passando em seguida, invariavelmente, a um predomínio de leucócitos mononucleares (Feigin e Shackelford, 1973; Amir *et al.*, 1991). Essa inversão pode ser confirmada em uma segunda punção lombar após 8 a 12 horas de observação. Na maioria dos casos, a dosagem de glicose no LCE é normal, mas valores um pouco abaixo do normal são encontrados em 18-33% dos casos (Avner *et al.*, 1975; Singer *et al.*, 1980). Igualmente, a proteína dosada no LCE está normal ou apenas discretamente elevada. A confirmação do diagnóstico depende da detecção do vírus no LCE por isolamento em cultura, por meio de PCR, ou, retrospectivamente, por métodos sorológicos. Além do LCE, a pesquisa dos enterovírus deve ser realizada em outros espécimes clínicos, em especial nas fezes e em swab retal, para aumentar a chance de isolamento viral.

A técnica de PCR para o diagnóstico de meningite e septicemia por enterovírus tem se mostrado um método rápido e sensível. Entretanto, ensaios de PCR desenhados para o diagnóstico de enterovírus não detectam HPeV. Assim, casos graves de infecções causadas por HPeV podem ser subdiagnosticados, pois a cultura do LCE tem sensibilidade baixa e a cultura de fezes e de swab de garganta nem sempre é realizada. A utilização de ensaios de PCR específicos para HPeV na investigação de septicemia neonatal e meningite em crianças com menos de 5 anos de idade mostrou um aumento significativo na definição etiológica (Wolthers *et al.*,

2008).

2.2.4.2 *Septicemia bacteriana de outras etiologias*

Septicemia causada por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* tipo b (com ou sem meningite), *Streptococcus pyogenes* (grupo A e B) e *Salmonella enteritidis* pode estar associada a exantema hemorrágico, que pode variar desde petéquias isoladas a *purpura fulminans* (Jacobs *et al.*, 1983; Baker *et al.*, 1989; Nielsen *et al.*, 2001). Em uma série de casos relatada por Nielsen *et al.* (2001), cerca de 2% dos casos de febre e exantema hemorrágico em crianças foram causadas por infecção invasiva bacteriana não meningocócica. O quadro clínico pode ser indistinguível da doença meningocócica invasiva e o diagnóstico etiológico muitas vezes só é possível através de exames laboratoriais específicos.

A febre purpúrica brasileira - descrita no Estado de São Paulo, em 1984 - é uma doença infecciosa grave causada por *H. influenzae* biogrupo *aegyptius*. Esta doença é caracterizada por febre alta que pode evoluir para púrpura, necrose periférica e choque em 12 a 48 horas, cuja característica principal é o início da doença com conjuntivite purulenta. Caso confirmado é definido pelo isolamento de *H. influenzae* biogrupo *aegyptius* de um sítio normalmente estéril em criança com quadro clínico compatível ou pelos seguintes critérios: doença febril aguda em crianças de 3 meses a 10 anos de idade, com dor abdominal ou vômitos, exantema hemorrágico, história de conjuntivite nos últimos 30 dias, ausência de meningite e exclusão de doença meningocócica por testes específicos. Caso provável é definido por febre, conjuntivite recente e exantema hemorrágico em criança de 3 meses a 10 anos (CDC, 1990)

Estafilococcia também pode ser causa de febre e exantema hemorrágico, mas em geral é possível determinar uma fonte de infecção provável (“porta de entrada”) através da história clínica e do exame físico. A ausência de uma “porta de entrada”, que ocorre em cerca de 10-20% dos casos, é um importante fator preditor de complicações. A incidência de complicações metastáticas é maior em pacientes sem fonte de infecção identificada (51%) quando comparados àqueles com sítio primário de infecção definido (21%) (Lautenschlager *et al.*, 1993). Praticamente, qualquer parte do corpo pode ser acometida secundariamente durante uma bacteremia por *S. aureus*. A endocardite infecciosa é uma complicação freqüente, que ocorre em até 10-15% dos pacientes com estafilococcia (Chang *et al.*, 2003). Todos os pacientes com bacteremia estafilocócica devem ser submetidos à investigação de endocardite infecciosa. Um ponto importante no diagnóstico diferencial do exantema hemorrágico da estafilococcia é a presença de vasculite subunguial e a púrpura pustulosa, que não são comuns na doença meningocócica.

A síndrome de Waterhouse-Friderichsen, caracterizada por exantema hemorrágico, coagulopatia, choque e hemorragia adrenal, está geralmente associada com meningococcemia fulminante, mas também já foi relatada na septicemia por *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *H. influenzae* e *Staphylococcus aureus* (Murph *et al.*, 1996; Adem *et al.*, 2005). A freqüência da síndrome de Waterhouse-Friderichsen em pacientes com infecção comunitária associada a *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA-CA) é ainda provavelmente baixa (Mongkolrattanothai *et al.*, 2003; Adem *et al.*, 2005). Entretanto, nos pacientes com sinais clínicos de doença fulminante, em virtude da gravidade do quadro, alguns autores já sugerem iniciar antibioticoterapia imediatamente, incluindo drogas com ação contra MRSA-CA até que se tenha a confirmação do agente etiológico por

cultura (Mongkolrattanothai *et al.*, 2003; Adem *et al.*, 2005).

Septicemia por *Capnocytophaga canimorsus*, embora seja uma etiologia mais rara, pode se manifestar como um quadro grave caracterizado por febre, coagulação intravascular disseminada, necrose de supra-renal, plaquetopenia, hipotensão e insuficiência renal (Band *et al.*, 2008). Manifestações dermatológicas ocorrem em até 50% dos pacientes e são caracterizadas por petéquias ou exantema maculo-papular (Foto 4). Frequentemente, os pacientes evoluem com diátese hemorrágica com lesões purpúricas cutâneas que podem evoluir para necrose de pele. A letalidade é de cerca de 25%. Cerca de 62% dos pacientes com septicemia por *C. canimorsus* têm algum fator de risco identificado, como esplenectomia (mais comum), doença de Hodgkin, púrpura trombocitopênica idiopática, alcoolismo, uso crônico de corticóide e doença pulmonar crônica. A infecção invasiva está fortemente associada com mordedura por cão, presente em mais de 50% dos casos. Adicionalmente, cerca de 20% dos casos têm contato com cão, sem história de mordedura ou arranhadura. Mordedura ou arranhadura de gatos, além de contato com animais selvagens também já foram relatados em alguns casos. Infecção por *C. canimorsus* deve ser considerada em pacientes com quadro clínico compatível associado à história de mordedura por cão ou contato com animais (Weber *et al.*, 2005).



Foto 4 Exantema petequeial rapidamente progressivo em paciente com septicemia por *C. canimorsus* (Band *et al.*, 2008).

2.2.4.3 Dengue

Dengue ou febre do dengue, a mais importante arbovirose humana, é um exemplo clássico de doença emergente. A sua apresentação é a de uma doença febril aguda, usualmente bifásica. Os quatro tipos (DEN-1, -2, -3, -4) do vírus do dengue são transmitidos pela picada do mosquito *Aedes*, um gênero notável de *Arthropoda*. As espécies transmissoras *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* se distinguem pela eficiência em transmitir o vírus, sendo a primeira considerada principal vetor – associada com epidemias abruptas – e a segunda um vetor ineficiente – causa de surtos prolongados – (Foto 5). Atualmente, no Brasil, circulam os vírus DEN-1, -2, -3. Em 2007, o vírus DEN-4 foi isolado de doentes na cidade de Manaus (Figueiredo *et al.*, 2008).



Aedes aegypti

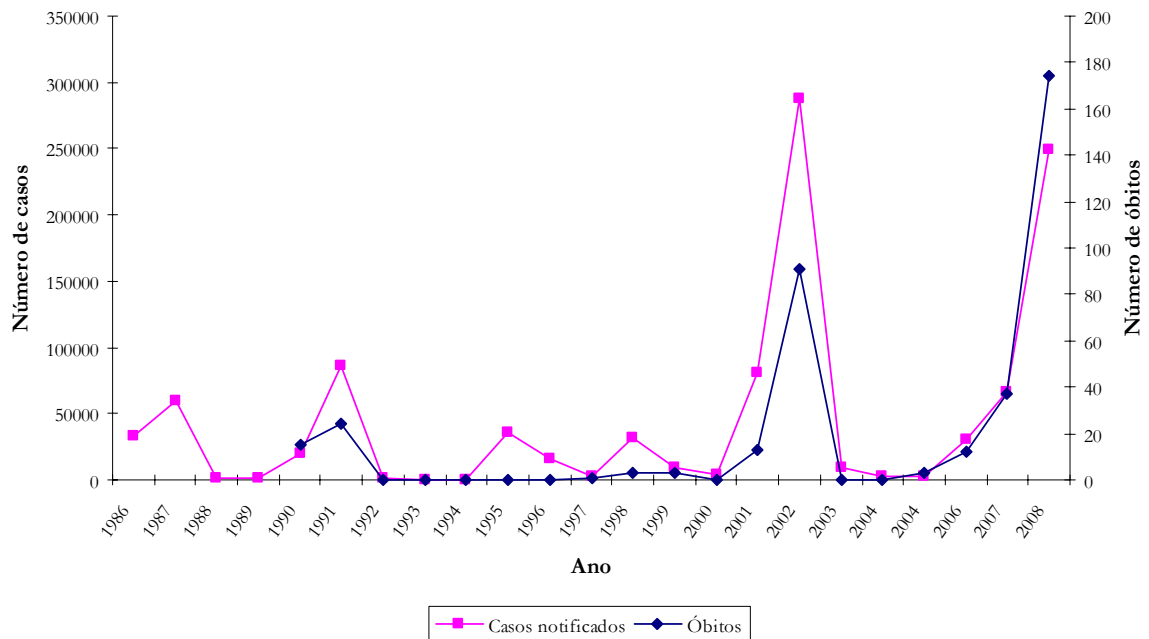


Aedes albopictus

Foto 5 Principais espécies de mosquitos *Aedes* transmissores de dengue (disponível em: www.inmetro.gov.br)

Desde a reintrodução do *A. aegypti* no Brasil em 1976, já ocorreram quatro grandes epidemias de dengue no Rio de Janeiro, em 1986-87 (vírus 1), 1990-91 (vírus 2), 2001-2003 (vírus 3) e 2007-2008 (vírus 2 e 3) (Gráfico 8).

Dengue no Estado do Rio de Janeiro 1986-2008



SESDEC-RJ/6SAS/SVS/CVE/DTI/SDTVZ

Gráfico 8 Série histórica de casos de dengue no Rio de Janeiro.

A infecção pelo vírus do dengue resulta em um amplo espectro clínico de manifestações, podendo resultar ou não em doença. Existem duas síndromes bem definidas causadas pelo vírus do dengue – febre do dengue e febre hemorrágica do dengue/síndrome do choque do dengue. Contudo um quadro febril de pouca gravidade, com resolução espontânea, é o mais comum. O período de incubação médio do dengue é de 4 a 7 dias, podendo variar de 3 a 14 dias. A maioria das crianças infectadas com o vírus do dengue é assintomática ou oligossintomática. Já os adultos apresentam manifestações clínicas mais freqüentemente, em 15 a 60% dos casos.

A febre do dengue é caracterizada por início súbito com febre alta, cefaléia, dor retroorbital, mialgia e artralgia (“febre quebra ossos”). É comum a sensação de intenso cansaço, hiporexia e, por vezes, náuseas, vômitos e diarreia. A febre, geralmente, tem duração de 5 a 7 dias. Exantema macular ou máculo-papular pode

surgir entre o segundo e o quinto dia após o início da febre, acometendo preferencialmente tórax, face e regiões flexoras, com duração de dois a três dias. Alguns pacientes, cerca de 5-6%, apresentam uma curva térmica bifásica, com o segundo período febril durando 1 a 2 dias. Após a resolução do quadro febril, a fadiga pode persistir por dias a semanas (Tsai *et al.*, 2005).

Em alguns casos (menos de 1%), ocorre o aumento da permeabilidade capilar entre o terceiro e o sétimo dia após o início dos sintomas (geralmente quando ocorre a defervescência), podendo levar a hipotensão e choque, o que caracteriza a febre hemorrágica do dengue/síndrome do choque do dengue. A alteração da permeabilidade vascular coincide com a queda acentuada das plaquetas e o aumento das aminotransferases. Dor abdominal pode preceder o aumento da permeabilidade capilar em até 60% dos casos e é considerado um sinal de alerta para o desenvolvimento de formas graves. Em até 50% dos casos mais graves são observadas petéquias e equimoses (Guzman *et al.*, 1987; Diaz *et al.*, 1988).

A utilização do termo febre hemorrágica do dengue, recomendada pela Organização Mundial da Saúde, induz os médicos e os pacientes a acharem que o sangramento é a principal ameaça da forma grave. Entretanto este raciocínio é incorreto, pois as manifestações hemorrágicas nem sempre estão presentes, além de não serem o principal componente de um desfecho fatal. De fato, as complicações hemorrágicas significativas costumam resultar do choque prolongado que é causado pela perda de fluidos para o terceiro espaço sem uma reposição rápida. Alternativamente, manifestações hemorrágicas, algumas vezes graves, podem acompanhar indivíduos com febre do dengue sem sinais de choque, usualmente nos adultos (Halstead, 2007).

A principal preocupação no dengue é a possibilidade de evolução para

choque decorrente da alteração da permeabilidade vascular, que pode ocorrer de forma súbita. Em geral, nos estágios iniciais da alteração da permeabilidade capilar, os pacientes estão com nível de consciência preservado e com aumento da pressão diastólica devido a vasoconstricção periférica secundária à perda de volume intravascular. Portanto o exame físico de um paciente com suspeita de dengue deve ser feito de forma cuidadosa e manobras para a pesquisa de hipotensão postural devem ser realizadas de forma sistemática (Halstead, 2007).

O diagnóstico inicial de dengue é clínico (história + exame físico da pessoa) feito essencialmente por exclusão de outras doenças. O diagnóstico diferencial entre doença meningocócica e dengue é muito simples, uma vez que o aparecimento de choque e exantema hemorrágico, quando presentes, ocorre mais tardiamente no dengue (a partir do terceiro dia) que na doença meningocócica (primeiro ou segundo dia) (Figura 7).

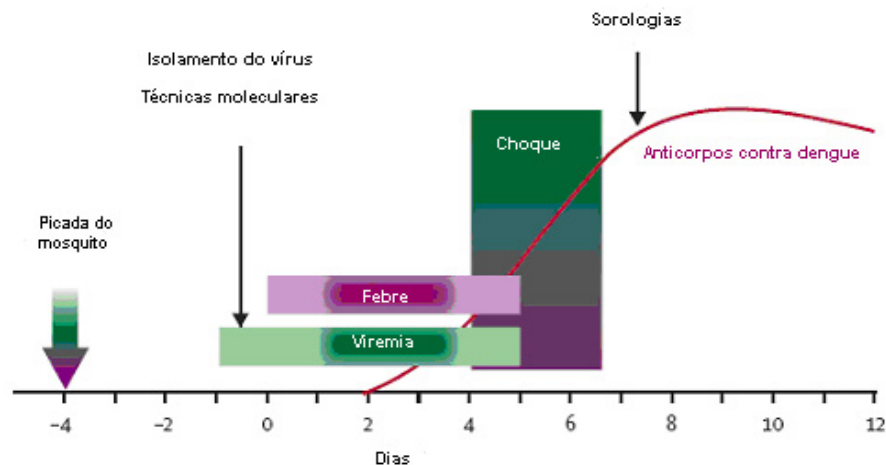


Figura 7 Evolução temporal da infecção pelo vírus do dengue (adaptado de Halstead, 2007)

A comprovação do diagnóstico de dengue, se for desejada por algum motivo, pode ser feita através de isolamento viral até o sexto dia de doença ou de sorologia, que começa a ficar reativa a partir do quarto dia após o início das

manifestações. Quando o exame sorológico é realizado logo no começo da doença, um resultado não reativo não permite afastar o diagnóstico de dengue. Nesse caso é necessária a coleta de uma segunda amostra, em geral, cerca de duas semanas após a primeira.

2.2.4.4 Febre maculosa brasileira

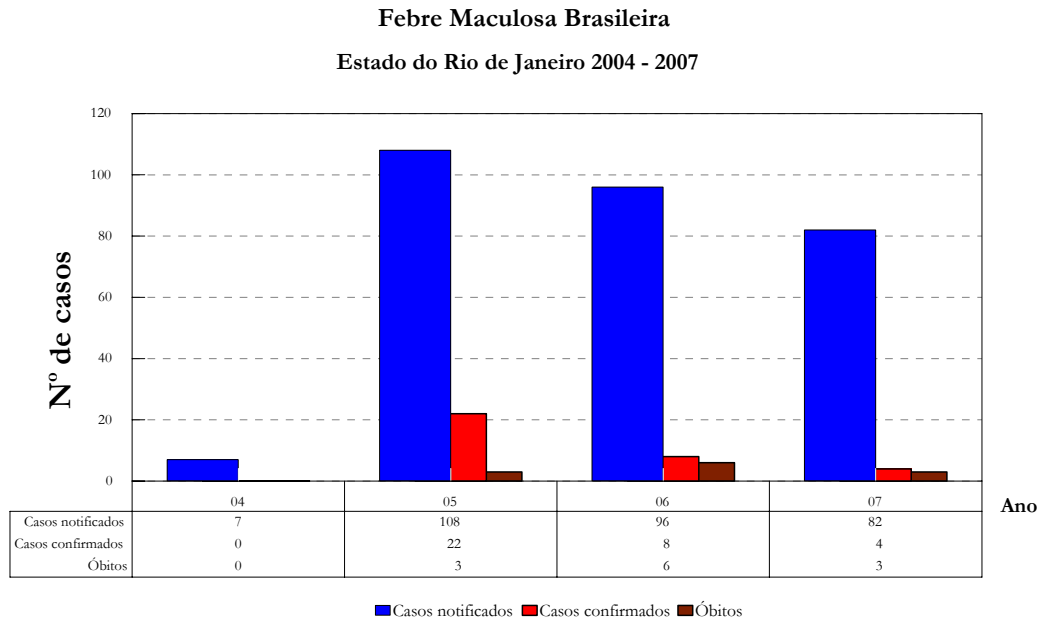
A febre maculosa brasileira é uma riquetsiose, causada pela espécie *Rickettsia rickettsii*, caracterizada por uma síndrome infecciosa aguda, potencialmente fatal, freqüentemente associada a exantema hemorrágico. A doença tem ampla distribuição no Continente Americano (do Canadá ao Brasil), recebendo denominações diferentes nas diversas regiões. Nos Estados Unidos, a doença é conhecida como febre maculosa das Montanhas Rochosas, no México como febre manchada e na Colômbia como febre petequial.

As espécies de carrapatos envolvidas e os reservatórios animais variam nas diferentes regiões geográficas. No Brasil, o principal vetor é o *Amblyomma cajennense*, vulgarmente conhecido como carrapato estrela, rodoleiro ou carrapato de cavalo (Foto 6). Existem relatos da doença em São Paulo, Rio de Janeiro (Gráfico 9), Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo. A infecção humana resulta, após um período de incubação de 3 a 12 dias (em média 5 a 7), em doença febril aguda com manifestações clínicas iniciais inespecíficas (febre, mialgia, cefaléia). Cerca de 90% das pessoas infectadas evoluem, geralmente, entre o 4º - 6º dia de doença, com aparecimento de lesões cutâneas purpúricas (petéquias e equimoses) (Fotos 7 e 8). As lesões tendem inicialmente a acometer as extremidades dos membros, envolvendo palmas e solas e, posteriormente, progridem em direção centrípeta, acometendo porção proximal dos membros, tronco, pescoço e face.



Foto 6 A e B - fêmea ingurgitada de *Amblyomma cajennense*. (disponível em: www.infobibos.com/Artigos/FebreMaculosa/carrapato.gif; Marcelo Campos Pereira)

Se não for tratada precocemente, a doença evolui para formas graves, com possível comprometimento do sistema nervoso central. Sinais de encefalite ocorrem em até 25% dos casos e crises convulsivas em cerca de 5% (Belman, 1999). A concomitância das alterações neurológicas com lesões petéquiás e purpúricas resulta em quadro muito semelhante à doença meningocócica. Entretanto, o aparecimento do exantema hemorrágico e das manifestações neurológicas, que comparativamente são menos frequentes, são mais tardias no curso das riquetsioses.



SESDEC-RJ/SAS/SVS/ADTVZ - SINANNET

Gráfico 9 Série de casos de febre maculosa no Rio de Janeiro, 2004 – 2007.

Quadro febril agudo associado à possibilidade de exposição a carrapatos são elementos de convicção para a suspeição do diagnóstico de riquetsiose, mesmo que na história clínica ou no exame físico não se tenha observado a fixação de carrapatos na pele. Em cerca de 30% dos casos confirmados de riquetsiose não há relato de fixação de carrapatos na pele (Dalton *et al.*, 1995; Treadwell *et al.*, 2000). De modo que, a história epidemiológica aliada à procedência do paciente são fundamentais para a suspeição diagnóstica.



Foto 7 Exantema hemorrágico em paciente com riquetsiose (ilustração Dra. Andréa Varon).



Foto 8 Exantema hemorrágico em paciente com riquetsiose (ilustração do Dr. Vinícius Menezes).

2.2.4.5 *Causas pouco freqüentes de exantema hemorrágico*

Outras doenças infecciosas, embora não tenham como apresentação clínica mais freqüente quadro febril agudo associado a exantema hemorrágico, também podem cursar com febre e púrpura, entre elas: doença gonocócica disseminada, leptospirose, tifo epidêmico e murino, infecção pelo parvovírus B19, Ebstein-Barr vírus, citomegalovírus e outras febres hemorrágicas virais. Em geral, estas doenças apresentam outras manifestações ou evolução clínica que permitem a exclusão do

diagnóstico de doença meningocócica.

Algumas viroses hemorrágicas, ainda não diagnosticadas no Brasil, são caracterizadas por quadro febril agudo associado às manifestações hemorrágicas, que na maioria das vezes se apresentam como sangramentos vultuosos, especialmente do trato gastrointestinal, como Marburg e Ebola. Eventualmente, as viroses hemorrágicas podem se apresentar com manifestações hemorrágicas cutâneas, como na febre hemorrágica Criméia-Congo. Essa patologia, causada por *Nairovirus* da família *Bunyaviridae*, é transmitida por carrapato, especialmente, do gênero *Hyalomma* (Foto 9), ocorre na Europa Oriental (particularmente na antiga União Soviética), no Mediterrâneo, noroeste da China, Ásia central, sul da Europa, África, Oriente Médio e Subcontinente Indiano. A transmissão para seres humanos ocorre através do contato com sangue de animais infectados (gado) ou com carrapatos. A transmissão também pode ocorrer de um ser humano para outro através do contato com sangue ou fluidos corporais de indivíduos infectados.



Foto 9 Carrapato *Hyalomma*: vetor do vírus da febre hemorrágica Criméia-Congo (disponível em: www.nano.org.uk).

O início da febre hemorrágica Criméia-Congo é súbito, com febre alta, cefaléia, artralgia, epigastralgia e vômitos. Hiperemia conjuntival e de orofaringe,

eritema facial e petéquias no palato são achados freqüentes. Icterícia pode estar presente e nos casos mais graves, observa-se alteração do humor e diminuição da consciência. Com a progressão da doença, em geral após o quarto dia, ocorre o aparecimento de equimoses cutâneas extensas, epistaxe e sangramento nos sítios de venopunção (Foto 10) (Mardani e Keshtkar-Jahromi, 2007). No Brasil, não há relatos desta doença.



Foto 10 Manifestações cutâneas de paciente iraniana com diagnóstico de febre hemorrágica Criméia-Congo com forma hemorrágica grave (ilustração de Mardini e Keshtkar-Jahromi, 2007).

Rickettsia africae, a causa da febre Africana por picada de carrapato (tradução do inglês de *African tick-bite fever - ATBF*), é endêmica em grande parte das zonas rurais da África, principalmente nos países subsaarianos. Apesar de uma alta soroprevalência de *R. africae* em nativos africanos, aproximadamente todos os casos de doença aguda descritos na literatura tem ocorrido em turistas europeus e americanos. Caçadas, visitas às zonas rurais e reservas no sul da África e viagem entre novembro e abril têm sido identificadas como fatores de risco independentes para *ATBF* em viajantes. Apesar de mais de 50% dos indivíduos infectados serem assintomáticos ou terem doença benigna e curso autolimitado, podem ocorrer complicações como febre prolongada, artrite reacional, sintomas

psiquiátricos agudos, neuropatia subaguda e miocardite aguda. Nos casos sintomáticos, após um período de incubação variando de 5 a 7 dias, mas podendo ser de até 10 dias, febre, cefaléia e mialgia estão presentes em 60 a 100% dos pacientes. A marca dessa doença é a escara de inoculação *tâche noire* (Foto 11), presente em 53-100% dos pacientes, e em até 54% dos casos são observadas múltiplas escaras, predominantemente localizadas nas extremidades inferiores acompanhadas de linfadenopatia regional, em geral, dolorosa. Exantema não é comum, notado em cerca de 15-46% dos pacientes, o qual quando presente normalmente é vesicular, maculopapular, ou maculovesicular, podendo excepcionalmente ser hemorrágico. A doença costuma ser leve ou moderada e resolve espontaneamente dentro de 10 dias ou responde rapidamente ao uso de doxiciclina ou ciprofloxacina. Nenhum caso de morte foi relatado até o momento (Cazorla *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2008; Roch *et al.*, 2008).



Foto 11 Escara de inoculação *tâche noire* (*black spot*) provocada por *Amblyomma hebraeum* em paciente com febre africana por picada de carrapato (disponível em: pediatrician-in-swaziland.blogspot.com/2007_04_01_archive.htm)

2.2.4.6 Causas não infecciosas

Algumas doenças não infecciosas também podem cursar com febre e exantema hemorrágico, e devem, portanto, ser consideradas no diagnóstico diferencial de doença meningocócica, especialmente nas formas leves e moderadas. Em uma série de casos, cerca de 5% das crianças que foram admitidas no hospital para investigação de febre e petéquias não tinham doença infecciosa (Van Nguyen *et al.*, 1984). As principais causas não infecciosas de febre e exantema hemorrágico descritas na literatura estão resumidas na tabela 2.

Tabela 2 Principais causas não infecciosas de febre e exantema hemorrágico

Doença de Kawasaki
Púrpura anafilactóide
Púrpura trombocitopênica idiopática
Leucemia
Reação à vacina contra sarampo, rubéola e caxumba
Reação alérgica a medicamentos

2.2.5 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico inicial da doença meningocócica é clínico. Diante da suspeita clínica não se deve aguardar o resultado de exames laboratoriais para iniciar o tratamento. Em toda doença bacteriana invasiva é esperado um aumento da proteína C reativa e da procalcitonina, que são elementos úteis para a diferenciação

entre doença bacteriana e viral. Em indivíduos saudáveis a concentração sérica da procalcitonina é geralmente muito baixa, i.e., $< 0,01$ ng/ml, e em infecções virais e processos inflamatórios a concentração está discretamente elevada, mas raramente acima de 1 ng/ml. Já em infecções bacterianas graves, a concentração de procalcitonina pode atingir níveis ≥ 500 ng/ml. A procalcitonina começa a aumentar cerca de 4 horas após a invasão bacteriana, atingindo o valor máximo em 6 horas e se mantendo elevada por até 24 horas. A proteína C reativa começa a aumentar mais tardiamente, em cerca de 6 a 12 horas (Pollard *et al.*, 1997; Carrol *et al.*, 2002). Alguns exames laboratoriais inespecíficos (p. ex. hemograma, gasometria arterial, escórias nitrogenadas, eletrólitos, glicemia, coagulograma) embora não tenham utilidade direta para o diagnóstico etiológico, são parâmetros importantes para adoção das medidas de suporte e devem ser monitorados.

Pacientes com meningite ou meningococemia leve, que têm uma baixa concentração de endotoxinas no plasma, em geral evoluem com leucocitose acentuada com desvio para esquerda. Entretanto, em pacientes com altas concentrações de lipooligosacarídeos no sangue (> 10 UE/ml), o número total de leucócitos pode estar normal ou até diminuído (van Deuren *et al.*, 2000). Existe uma relação inversa entre a gravidade da septicemia e a contagem de leucócitos em sangue periférico. Leucócitos, primariamente neutrófilos, sofrem marginalização e adesão às células endoteliais da vasculatura periférica devido à regulação de moléculas de adesão. Esses neutrófilos aderidos são ativados e liberam proteases junto à superfície das células endoteliais, lesando ainda mais o endotélio vascular.

O padrão ouro para o diagnóstico da doença meningocócica é o isolamento de *N. meningitidis* de fluidos corpóreos estéreis como sangue ou LCE, ou menos freqüentemente, de líquido sinovial, pleural ou pericárdico. O isolamento bacteriano

é importante para a confirmação etiológica e é essencial para a determinação do padrão de sensibilidade do microorganismo aos antibióticos. A redução da sensibilidade de *N. meningitidis* a alguns antimicrobianos (penicilina, cloranfenicol e cefalosporina) vem sendo relatada de forma crescente (Sprott *et al.*, 1988; Saez-Nieto *et al.*, 1992; Angyo e Okpeh, 1998; Fangio *et al.*, 2005), o que torna imprescindível a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos sempre que possível.

A coleta do material, o transporte e a semeadura adequados são de fundamental importância para o bom rendimento da cultura. As culturas, sempre que possível, devem ser coletadas antes da administração da primeira dose de antibiótico. Entretanto, nunca se deve postergar o início da terapia visando a coleta de material. A frequência de hemoculturas positivas varia de acordo com a apresentação clínica da doença. Nos casos de meningite isolada, a sensibilidade da hemocultura é de 50%, enquanto nos casos de meningococemia varia entre 77 a 87%, chegando a 93% nos casos de septicemia fulminante (Brandtzaeg, 2006). A utilização de antibiótico antes da coleta da hemocultura reduz a positividade em cerca de 50% (Levin e Painter, 1966; Durand *et al.*, 1993).

Pelo menos um frasco de hemocultura deve ser coletado na admissão hospitalar. Deve-se realizar a anti-sepsia da área a ser puncionada com álcool a 70%, seguido de tintura de iodo a 1-2% ou clorexidina alcoólica 0,5% (Strand *et al.*, 1993; Little *et al.*, 1999; Mimos *et al.*, 1999). Após aplicação do anti-séptico, deve-se esperar a secagem, que ocorre em 1 a 2 minutos. Se for necessária a palpação da veia durante a coleta de sangue, é recomendada a utilização de luva estéril para a realização do procedimento (Archibald *et al.*, 2006). A coleta da amostra através de cateter intravenoso no momento da inserção está relacionada com uma maior taxa

de contaminação e deve ser evitada (Norberg *et al.*, 2003). Parece haver uma redução da contaminação quando se faz a troca de agulha entre a coleta e a inoculação no frasco de hemocultura (Spitalnic *et al.*, 1995). Entretanto, devido ao risco de acidente ocupacional durante a troca de agulha, este procedimento não é mais recomendado.

O rendimento da hemocultura está diretamente relacionado ao volume de sangue coletado. Para cada frasco de hemocultura devemos manter uma proporção de 1:10; pelo menos 5 a 10 ml de sangue de adulto e 0,5 a 1 ml de crianças para os frascos de 50 ml, 100 ml, 5 ml e 10 ml, respectivamente (Brown *et al.*, 1995; Isaacman *et al.*, 1996; Schelonka *et al.*, 1996; Connell *et al.*, 2007). Quando for possível deve-se coletar um volume maior de sangue (adulto = 20 ml; criança: menor que 1 mês = $\geq 0,5$ ml; entre 1 e 36 meses = ≥ 1 ml; maiores de 36 meses = > 4 ml) e distribuir em mais de um frasco de hemocultura. Quando mais de uma amostra de hemocultura for coletada, devemos utilizar sítios de punção diferentes e o intervalo entre as coletas deve ser curto (minutos), pois é essencial o início imediato da antibioticoterapia. Os métodos automatizados de hemocultura têm, reconhecidamente, uma sensibilidade menor para a detecção precoce de *N. meningitidis* (Schnur *et al.*, 1989).

A punção lombar para obtenção de amostra do LCE deve ser realizada em todos os pacientes com suspeita de meningite ou meningococcemia, que não tenham contra-indicação ao procedimento. A análise do LCE nos casos de doença meningocócica apresenta valor diagnóstico e prognóstico. As principais contra-indicações para a realização da punção lombar são insuficiência cardiorrespiratória, sinais clínicos de hipertensão intracraniana (hipertensão arterial, anisocoria, tônus muscular anormal, ritmo respiratório irregular, bradicardia), coma (escala de

Glasgow < 8), sinais neurológicos focais, instabilidade hemodinâmica, papiledema (raro, especialmente em crianças), coagulopatia e presença de infecção de pele ou tecidos adjacentes no local de realização do procedimento (Nadel, 2001). Uma punção lombar tardia pode confirmar o diagnóstico de meningite, desde que as alterações citológicas e bioquímicas permanecem no LCE até 44 a 68 horas após o início do tratamento com antibiótico. Esta informação pode orientar o tratamento subsequente e é crucial quando há um diagnóstico diferencial de malária cerebral, uma vez que isto não pode ser clinicamente diferenciado da meningite bacteriana, além das duas condições poderem coexistir.

O aspecto claro do LCE não exclui a presença de células, pois pelo menos 200 céls/mm³ devem estar presentes para que o LCE pareça turvo (Tunkel, 2005). Quando há meningite meningocócica, virtualmente todos os pacientes têm aumento de leucócitos no LCE (100-10.000 céls/mm³), com proteína elevada e glicose reduzida. A ocorrência de acidente durante a punção lombar pode causar sangramento e contaminação do LCE com sangue, levando a interferência na contagem da celularidade. Algumas fórmulas podem ser utilizadas para auxiliar na interpretação da contagem de células quando há acidente de punção (e.g. subtrair 1 leucócito para cada 700 hemácias/mm³ presentes no LCE). Entretanto, nenhuma fórmula pode ser utilizada com total segurança para excluir meningite quando há acidente de punção (Bonadio *et al.*, 1990).

O LCE deve ser enviado ao laboratório logo após a coleta, para evitar a lise dos neutrófilos e a redução do rendimento da cultura. A contagem dos neutrófilos pode ser reduzida em até 32% após 1 hora e em até 50% após 2 horas em temperatura ambiente (Steele *et al.*, 1986; Gray e Fedorko, 1992). *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* são organismos fastidiosos e podem não sobreviver por

tempo prolongado durante o transporte ou a variações de temperatura. A refrigeração pode dificultar o isolamento destes agentes. Desta forma, se os espécimes não puderem ser processados imediatamente, devem ser armazenados em temperatura ambiente ou em estufa (37⁰C) (Gray e Fedorko, 1992).

A probabilidade de detecção de microorganismos por exame direto e cultura está diretamente relacionada com o volume de material que é examinado (Tenney *et al.*, 1982). Para a detecção de bactérias, 1 a 2 ml de LCE são, em geral, suficientes. Para aumentar a sensibilidade do exame direto e da cultura, o LCE deve passar por um processo de concentração. O número de bactérias presentes no LCE de um paciente com meningite meningocócica é em média de $1,27 \times 10^5$ UFC/ml, mas pode ser bem menor, de até 10 UFC/ml (Feldman, 1977; Gray e Fedorko, 1992). Além disto, cerca de 50% dos pacientes com meningite recebem antibiótico antes da coleta do LCE, o que pode reduzir a número de bactérias no LCE em 10^{-2} a 10^{-6} vezes (Dalton e Allison, 1968; Murray e Hampton, 1980).

Em geral, quando o laboratório de microbiologia recebe < 0,5 ml de LCE, todo o volume é utilizado para exame direto e cultura sem passar por processo de concentração. Quando o volume é maior que 0,5 ml deve-se centrifugar a amostra por pelo menos 15 minutos a 1.500 a 2.000 x g. O sobrenadante deve ser retirado por decantação em um tubo estéril, deixando cerca de 0,5 ml para suspensão do sedimento, que deve ser realizado, de preferência, através da utilização de um vórtex. O sedimento deve ser utilizado para inoculação em meio de cultura e para o exame direto (Murray e Hampton, 1980). Nos casos de meningite meningocócica, 60 a 90% das amostras têm bacterioscopia positiva pelo método de Gram, evidenciando diplococos Gram negativos (Foto 12). Entretanto, a utilização precoce do antibiótico antes da coleta do LCE reduz a identificação da bactéria pela

bacterioscopia em cerca de 20% dos casos de meningite bacteriana (Bohr *et al.*, 1983; Cartwright *et al.*, 1992; Ragunathan *et al.*, 2000; Kanegaye *et al.*, 2001; Bryant *et al.*, 2004).

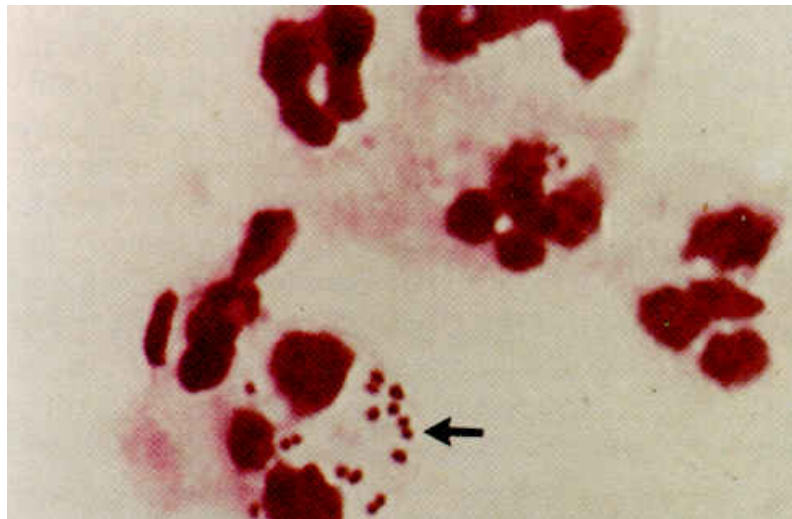


Foto 12 Diplococos Gram negativos (x1000) na posição endoleucocitária observada em esfregaço de LCE (Fonte: Rosentein *et al.*, 2001).

O isolamento primário de *N. meningitidis* é obtido com sucesso com a utilização de meio agar Müller-Hinton chocolate, preparado com sangue de coelho ou carneiro a 10% (Thayer *et al.*, 1965; Morello *et al.*, 1991). As culturas devem ser mantidas em uma atmosfera 3-5% de CO₂, com uma umidade em torno de 50%, para favorecer o crescimento bacteriano. A temperatura ideal da estufa bacteriológica é de 36⁰C (35-37⁰C). Temperaturas abaixo de 30⁰C inibem o crescimento e acima de 40⁰C a bactéria não sobrevive por mais de 90 minutos (Morello *et al.*, 1991). A sensibilidade da cultura do LCE também varia de acordo com a apresentação clínica da doença. Nos pacientes com meningite, a sensibilidade fica em torno de 80 a 90%, já nos pacientes com meningococemia isolada a sensibilidade é de 47% e nos casos de septicemia fulminante é de 59%

(Brandtzaeg, 2006). A utilização de antibiótico antes da coleta do LCE reduz a positividade da cultura em aproximadamente 30% (Bohr *et al.*, 1983; Cartwright *et al.*, 1992; Ragunathan *et al.*, 2000; Kanegaye *et al.*, 2001; Bryant *et al.*, 2004).

O tempo entre a administração da primeira dose de antibiótico e a negatificação da cultura do LCE parece ser mais curto do que se imaginava. Isto ficou demonstrado em um estudo realizado por Kanegaye *et al.*, em que a punção lombar foi realizada após a utilização de antibiótico ou de forma seriada. Entre as crianças com meningite meningocócica tratadas com cefalosporina de terceira geração, três em nove amostras de LCE tiveram cultura negativa em uma hora (uma em até 15 minutos) e todas as amostras de LCE tiveram cultura negativa em duas horas.

Alguns estudos mostram que é possível isolar ou detectar *N. meningitidis* através da cultura ou ensaio de PCR de aspirado ou biópsia de lesões equimóticas, respectivamente. É possível também identificar diplococos Gram negativos pela coloração pelo método de Gram do raspado ou do aspirado das lesões hemorrágicas cutâneas. Esta técnica foi descrita e avaliada com sucesso na primeira metade do século XX, com resultados positivos em 68% a 83% das lâminas coradas pelo método de Gram e 87,5% das culturas de lesões de pele (McLean e Caffey, 1931; Tomkins, 1943; Bernhard e Jordan, 1944; Barroso, 1998). Atualmente o método de PCR tem sido usado para detecção de DNA bacteriano de lesões hemorrágicas de pacientes, assim como para o diagnóstico *post-mortem* (Morentin e Fernandez-Rodriguez, 2006).

Métodos laboratoriais baseados na identificação de antígenos bacterianos, pelas técnicas de contraímunoeletroforese, coaglutinação e aglutinação pelo látex, também estão disponíveis para o diagnóstico no LCE dos principais agentes etiológicos de meningite bacteriana (Muller *et al.*, 1989; Gray e Fedorko, 1992).

Estas técnicas são mais eficientes em detectar antígenos de *H. influenzae*. A contraimuno eletroforese é menos eficiente em detectar antígenos do *Streptococcus* grupo B e a coaglutinação e a aglutinação pelo látex menos eficientes para *N. meningitidis* (Gray e Fedorko, 1992). Atualmente, a contraimuno eletroforese é raramente utilizada, pois foi substituída pela coaglutinação e a aglutinação pelo látex, que são técnicas mais simples e com maior sensibilidade (Gray e Fedorko, 1992). Entretanto, a utilização prévia de antibiótico parece interferir de forma negativa no resultado da pesquisa de antígenos no LCE, reduzindo o seu rendimento (Nigrovic *et al.*, 2004).

A coaglutinação tem sensibilidade em torno de 67% para identificação de antígenos de *N. meningitidis* no LCE. A sensibilidade do teste de látex depende do kit comercial utilizado e da bactéria envolvida. Para *N. meningitidis*, a sensibilidade é de aproximadamente 56 a 74% (Gray e Fedorko, 1992). O teste do látex está disponível para a identificação dos sorogrupos A, B, C, Y e W₁₃₅. A sensibilidade dos kits para o sorogrupo B é mais baixa que para os outros sorogrupos em geral (McGraw e Bruckner, 1984). Os métodos baseados na detecção de antígenos não substituem a cultura e a coloração pelo método de Gram. Se apenas uma pequena alíquota de LCE estiver disponível, a prioridade deverá ser sempre para a realização da cultura e do Gram (Gray e Fedorko, 1992).

Mais recentemente, a utilização de métodos moleculares para o diagnóstico de meningite tem sido uma ferramenta importante para a determinação da etiologia, especialmente nos casos em que o paciente recebeu antibiótico antes da coleta do LCE ou sangue (Taha, 2000; Corless *et al.*, 2001). A aplicação da técnica de reação de PCR, no diagnóstico de casos suspeitos de meningite aguda, tem sido crescentemente adotada como uma prioridade em diversos países (Taha, 2000;

Corless *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2004). A validação do método mostrou ser superior comparado com a cultura e métodos de aglutinação ou coaglutinação. Quando empregado no LCE, a sensibilidade do ensaio de PCR é de 80%-90% e a especificidade de 90-100%. No caso de sangue a sensibilidade é bastante menor, em torno de 50% (Newcombe *et al.*, 1996). O emprego da reação de PCR pode aumentar o diagnóstico laboratorial da doença meningocócica em mais de 30%. Além disto, a introdução deste ensaio identificou que a aglutinação não permite identificar o sorogrupo ou sorotipo corretamente de todas as bactérias, devido à reação cruzada entre antígenos capsulares de uma mesma espécie, ou a possibilidade de não detecção destes antígenos.

A abordagem para a identificação de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, independente do seu sorogrupo ou sorotipo, consiste num ensaio de multiplex PCR de triagem desenhado para a amplificação dos genes conservados *crgA*, *ply* e *bexA/HiP6*, respectivamente, por oligonucleotídeos específicos. Os genes estão envolvidos com a adesão às células alvo (*crgA*), no transporte dos polissacarídeos capsulares (*ply*, *bexA*) ou na codificação de proteínas da parede celular (*HiP6*). O primer *HiP6* permite identificar *H. influenzae* não capsulados (NT b-/NC). Identificado o agente bacteriano, um segundo ensaio de PCR é executado. Para a determinação do sorogrupo de *N. meningitidis* utiliza-se um ensaio com oligonucleotídeos nos genes *siaD* (B, C, Y, W₁₃₅), *orf-2* (A) e *ctrA* (29E, X, Z), necessários para a biossíntese dos polissacarídeos capsulares. Os produtos do PCR amplificados são analisados através da eletroforese em gel de agarose padrão a 2% sobre a fluorescência de UV após a coloração pelo brometo de etídio.

A técnica de PCR tem inúmeras vantagens em relação à cultura para o diagnóstico de infecção meningocócica. O resultado da reação de PCR está

freqüentemente disponível no mesmo dia do início das manifestações comparado com 24-48 horas para a confirmação do diagnóstico pela cultura. Outra vantagem é que a sensibilidade do método não é afetada pelo uso prévio de antibiótico, pois não depende da viabilidade da bactéria para a positividade do teste. A utilização de PCR multiplex permite a testagem simultânea de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* (Ni *et al.*, 1992; Newcombe *et al.*, 1996; Borrow *et al.*, 1998; Bryant *et al.*, 2004). Apesar do método de PCR ter vantagens inquestionáveis, este método não deve ser utilizado em substituição a cultura. Apesar da susceptibilidade do microrganismo poder ser determinada por meio de PCR, apenas a resistência à penicilina tem sido testada com fins epidemiológicos. Ademais a cultura é fundamental para a detecção de bactérias que sofreram recombinação ou novos patógenos envolvidos com um mesmo espectro clínico (Tsang *et al.*, 2008).

2.2.6 Tratamento

A antibioticoterapia precoce e adequada melhora de forma significativa o prognóstico da doença meningocócica. Uma vez levantada a possibilidade de doença meningocócica, deve-se iniciar a administração de antibiótico específico entre 15 e 20 minutos, ou no máximo até 30 minutos (Tunkel, 2005). A coleta de hemocultura deve ser realizada simultaneamente com a tentativa de acesso venoso, e a antibioticoterapia deve ser administrada em seguida. Neste momento a punção lombar é avaliada, e mesmo que se decida pela sua realização a antibioticoterapia não pode ser retardada. Em casos suspeitos de meningite bacteriana, o tratamento antimicrobiano deve ser amplo o suficiente para garantir o tratamento das possíveis etiologias, que podem variar de acordo com a faixa etária e a condição de base do

paciente.

O tratamento dos casos suspeitos de doença meningocócica deve ser feito com uma cefalosporinas de terceira geração, e.g., ceftriaxona (100 mg/Kg dia, divididos de 12/12 horas, até a dose máxima de 4 g/dia) ou cefotaxima (200-300 mg/Kg dia, divididos de 4/4 horas, até o máximo de 8-12 g/dia), até que se tenha o isolamento bacteriano em cultura com o resultado do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (Tunkel *et al.*, 2004). Se o microorganismo comprovadamente for sensível à penicilina, com concentração inibitória mínima (MIC) < 0,1 µg/ml, o tratamento eventualmente pode ser trocado para penicilina (300.000 unidades/kg por dia, divididos de 4/4 horas, até o limite máximo de 24 milhões de unidades/dia). Para isolados com MIC ≥ 0,1 µg/ml o tratamento deve ser mantido com cefalosporina de terceira geração. A duração do tratamento antimicrobiano varia de acordo com a gravidade inicial da doença e com a resposta terapêutica do paciente. Nos casos, em que o meningococo é totalmente sensível ao antibiótico utilizado, em geral, sete dias de tratamento são suficientes (Tunkel *et al.*, 2004). Esquemas de tratamento mais curtos já foram testados durante epidemias, mas não são recomendados de rotina.

O primeiro relato de *N. meningitidis* resistente à penicilina foi em 1988 (Mendelman *et al.*, 1988). A resistência intermediária à penicilina é determinada por redução da afinidade de proteínas fixadoras de penicilina. Embora cepas com sensibilidade reduzida sejam pouco freqüentes, é necessário manter um alto grau de vigilância e pensar nesta possibilidade quando há falha terapêutica e nos casos de persistência da febre por mais de quatro dias. O cloranfenicol (100 mg/kg dia IV, divididos de 6/6 horas, até o máximo de 4 g/dia) é uma alternativa terapêutica para os pacientes com alergia grave à penicilina; entretanto, a emergência de resistência

também é uma preocupação (Galimand *et al.*, 1998).

O tratamento de suporte da doença meningocócica também deve ser entendido como uma prioridade e requer uma equipe médica capacitada em terapia intensiva, em doenças infecciosas e no manejo de coagulopatias. A primeira medida é assegurar uma via aérea pérvia e tentar corrigir a hipoxemia. Em alguns casos, isto só é possível com intubação orotraqueal e ventilação mecânica. Se o paciente apresentar sinais de hipoperfusão tecidual (enchimento capilar lentificado, hipotensão), deve-se tentar restabelecer a perfusão o mais rapidamente possível, para evitar disfunção orgânica e reduzir a letalidade. Para isto deve ser utilizada hidratação venosa vigorosa e, sempre que necessário, agentes inotrópicos positivos e o uso de solução colóide, em especial albumina humana a 4,5%, nos pacientes com choque persistente com profundo extravasamento capilar. A utilização de concentrados de proteína C em paciente com septicemia meningocócica grave parece ter benefícios, mas que ainda não foram comprovados até o momento. O uso de glicocorticóides no tratamento da doença meningocócica não está estabelecido e não deve ser feito de rotina (Pollard *et al.*, 1999; van de Beek *et al.*, 2007).

2.2.7 Prevenção

As medidas básicas de prevenção da doença meningocócica incluem quimioprofilaxia e vacinação sorogrupo específico. A taxa de ataque da doença meningocócica em contactantes próximos de um paciente é de aproximadamente 1 para cada 250 pessoas expostas, i.e. 0,4%, o que é cerca de 500 a 800 vezes maior do que na população em geral (Bilukha e Rosenstein, 2005). A definição de contactantes próximos pode ser variável de um país para outro e a identificação

destes indivíduos, em geral, não é tarefa fácil e depende de uma investigação epidemiológica adequada. Não é incomum que todos os conhecidos de um indivíduo com doença meningocócica se julguem contactantes próximos e desejem receber quimioprofilaxia. Porém, a utilização da quimioprofilaxia em massa além de não ter impacto no controle da doença, não é isenta de riscos, pois os antibióticos utilizados para a profilaxia podem, eventualmente, estar associados com efeitos colaterais ou induzir o aparecimento de cepas bacterianas resistentes. A quimioprofilaxia não está indicada para os indivíduos que tiveram contato curto com o doente, o que inclui a maioria dos profissionais de saúde com exceção daqueles que tiveram contato direto com as secreções respiratórias do doente sem equipamentos de proteção individual (máscara e luvas).

A quimioprofilaxia deve ser administrada para todos os contactantes intradomiciliares o mais rápido possível após a identificação do caso índice, idealmente nas primeiras 24 horas, ou quando não for possível até o 14^o dia. A escolha do melhor esquema de quimioprofilaxia é aquele que utiliza uma droga de uso oral, em dose única e com pouca possibilidade de efeitos colaterais. As opções, em geral, incluem rifampicina, ciprofloxacina, ceftriaxona e azitromicina. Em uma meta-análise realizada em 2006, a rifampicina e a ciprofloxacina foram efetivas na erradicação de *N. meningitidis* da nasofaringe até a segunda semana. A rifampicina continuou sendo efetiva até a quarta semana, mas observou-se a emergência de cepas resistentes a este antibiótico. O ceftriaxona foi mais efetivo que a rifampicina em 1 a 2 semanas após a instituição da quimioprofilaxia. A ciprofloxacina não é recomendada para quimioprofilaxia em algumas regiões dos Estados Unidos e Espanha devido a emergência de isolados resistentes a ciprofloxacina em pacientes (Fraser *et al.*, 2006). Mesmo durante epidemias ou surtos, a quimioprofilaxia é

recomendada apenas para os contactantes intradomiciliares e aqueles que conviveram com o paciente mais de 4 horas consecutivas nos últimos 7 dias que antecederam o início dos sintomas ou que tiveram contato direto com a saliva do paciente. Nessas situações, deve ser considerada a utilização da vacina como medida profilática, quando o sorogrupo causador da doença for identificado.

Em pacientes com doença meningocócica invasiva, o tratamento com outros agentes que não as cefalosporinas de terceira geração não erradica de forma confiável *N. meningitidis* da nasofaringe. Portanto, antes da alta hospitalar estes pacientes devem receber quimioprofilaxia para erradicação da bactéria da nasofaringe para evitar a transmissão para os contactantes próximos (Barroso, 1999).

Cabe aos serviços de vigilância epidemiológica a identificação precoce de surtos e epidemias e a definição da população alvo para a vacinação. A maioria das vacinas disponíveis contra a doença meningocócica é constituída por antígenos polissacarídicos da cápsula da bactéria e confere proteção por tempo limitado (cerca de três a cinco anos), exclusivamente para os sorogrupos contidos na vacina. A eficácia é reduzida em crianças de baixa idade (menores de 2 anos). As mais freqüentemente empregadas são a vacina bivalente (A+C), a tetravalente (A+C+Y+W₁₃₅). Para a meningite meningocócica B nenhuma vacina desenvolvida até então, inclusive a VaMengoc B+C[®], mostrou-se eficaz em crianças abaixo de 4 anos ou contra sorotipos heterólogos ao da vacina (Granoff *et al.*, 2004).

Na década de 1990, foi desenvolvida uma vacina conjugada contra o sorogrupo C, com elevada eficácia, proteção prolongada (possivelmente por toda a vida) e boa resposta em menores de dois anos (Stephens, 2007). Em alguns países como a Inglaterra e em algumas regiões do Canadá e da Espanha, esta vacina já foi

adotada de forma rotineira no calendário vacinal infantil. Em 2005, a vacina A+C+Y+W₁₃₅ conjugada foi licenciada em alguns países e está recomendada, nos Estados Unidos, para indivíduos com mais de 2 anos de idade.

No Brasil, embora a vacina antimeningocócica C conjugada esteja recomendada de rotina pela Sociedade Brasileira de Pediatria, aos 3, 5 e 12 meses de idade, esta vacina não faz parte do calendário básico vacinal adotado pelo Ministério da Saúde e não está disponível gratuitamente para população em geral. A vacina conjugada C está disponível apenas nos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIE) exclusivamente para pessoas a partir dos 2 meses de idade e que tenham doenças ou condições de base que impliquem em um maior risco de doença meningocócica (asplenia congênita ou adquirida, esplenectomia, deficiências de complemento, anemia falciforme e talassemia). As vacinas antimeningocócicas polissacarídicas estão disponíveis através do Ministério da Saúde apenas em situações de surtos ou epidemias. Na rede privada, podem ser encontradas as vacinas polissacarídica A+ C e a conjugada C. As vacinas tetravalentes polissacarídica ou conjugada ainda não têm registro no país.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a etiologia dos casos suspeitos de doença meningocócica invasiva por meio de métodos moleculares na população do Estado do Rio de Janeiro.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a etiologia dos casos de febre com exantema hemorrágico com ou sem meningite, que não tiveram confirmação laboratorial pelos métodos de cultura ou teste do látex, utilizando um ensaio de multiplex PCR de triagem.
- Determinar os sorogrupos por PCR (genogrupagem) dos casos positivos para *N. meningitidis* pelo ensaio de triagem.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho, local e população do estudo

Desenvolvemos um tipo de estudo prospectivo descritivo para a investigação de casos suspeitos de doença meningocócica através da utilização da reação de PCR. As amostras foram selecionadas de acordo com os critérios estabelecidos abaixo dentre aquelas recebidas (Figura 8), no período de 2004 a 2005, no Laboratório de Referência para Meningites do Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião (IEISS). O antigo IEISS ficava localizado no bairro do Caju, zona portuária da cidade do Rio de Janeiro, e era o Centro de Referência para Doenças Infecciosas no Estado do Rio de Janeiro. Durante o período do estudo, o hospital oferecia 50 leitos de enfermaria (20 pediátricos e 30 de adultos) e nove leitos de Unidade de Terapia Intensiva, o que representava cerca de 70% da sua capacidade de ocupação total. Das amostras selecionadas no Laboratório de Referência, apenas 39% (30/76) eram de pacientes internados naquele Instituto, a maioria (61%) era de pacientes internados em outros hospitais da rede pública ou privada.

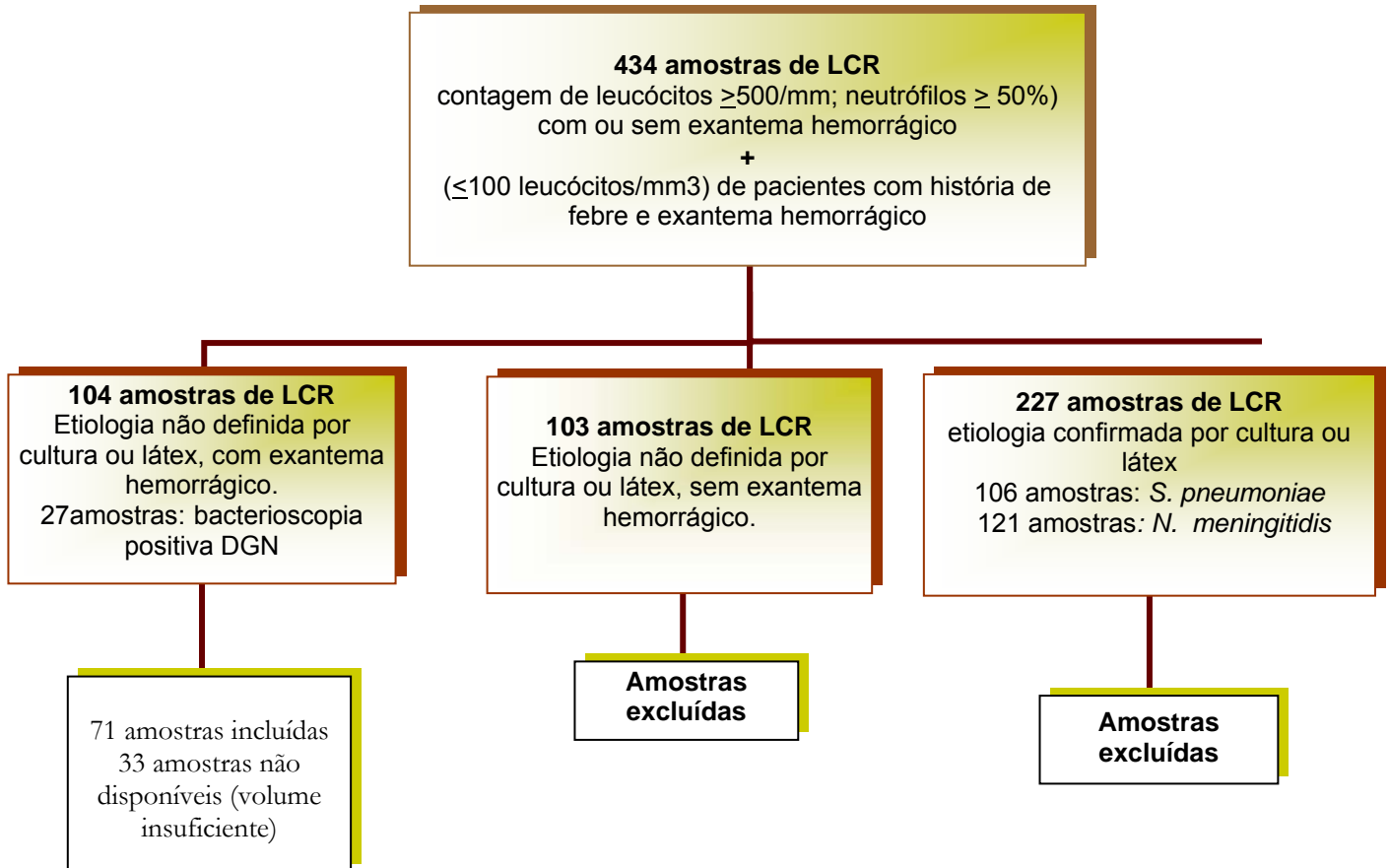


Figura 8 Organograma das amostras selecionadas no IEISS, no período de 2004 a 2005.

No laboratório do IEISS, as amostras de LCE foram processadas de rotina para citometria (total e diferencial), provas bioquímicas (glicose e proteína), bacterioscopia (coloração pelo método de Gram), teste do látex e cultura (agar chocolate). Após serem processados, os espécimes foram acondicionados em frascos estéreis e armazenados a 20°C negativos.

A citometria global e específica é realizada através da análise, sob microscopia óptica com aumento de 400x, de uma alíquota de LCE depositada na câmara de Fuchs-Rosenthal, após coloração com um corante a base de cristal violeta (0,2%) e ácido acético (10%). A determinação da glicose é realizada pelo método enzimático (oxidase e peroxidase) colorimétrico automatizado. A dosagem de proteínas é feita pelo método turbidimétrico manual, após adição de ácido

tricloroacético a 3%. A bacterioscopia é realizada pela microscopia óptica, com aumento de 1000X, de um esfregaço de LCE, não centrifugado, em lâmina corado pelo método de Gram modificado por Hucker. Todas as lâminas são avaliadas por dois profissionais diferentes. A cultura é feita pela semeadura de 3 gotas de LCE num tubo de agar Müller-Hinton inclinado suplementado com 10% de sangue de carneiro aquecido (chocolate). Os tubos são incubados em estufa a 37°C, dentro de uma jarra vedada com chama de vela para obter uma concentração de 3% de CO₂, e cerca de 50% de umidade obtida com um frasco de água aberto. As culturas são mantidas incubadas por 48 horas, com leitura por inspeção visual a cada 24 horas, quando então aquelas sem crescimento são descartadas como negativas. Os antígenos bacterianos nos espécimes de LCE são pesquisados com o reagente comercial *BD Directigen Meningitis Combo Test*® (Becton, Dickinson and Company®), que utiliza anticorpos de coelho (*N. meningitidis* sorogrupos A, C, Y/W₁₃₅, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *S. agalactiae*) ou rato (*N. meningitidis* sorogrupo B/E, *E. coli* K1) ligados a partículas de látex, os quais promovem uma aglutinação perceptível à inspeção visual, em 1 a 2 minutos, quando em contato com o antígeno específico.

As amostras selecionadas foram encaminhadas ao antigo Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, acompanhadas de ficha padronizada (anexo I), para a investigação das três principais etiologias bacterianas de meningite aguda por ensaios de PCR. Foram incluídas no estudo as amostras de LCE de casos de meningite com exantema hemorrágico ou de meningococemia que não tiveram o diagnóstico confirmado pela cultura e o teste do látex, porém a bacterioscopia positiva não excluiu a inclusão destes casos. Incluímos ainda amostras de sangue daqueles casos de meningococemia, com hemocultura

negativa e que não foram submetidos à punção lombar.

4.2 Definição de caso

- **Casos suspeitos de meningite com meningococemia (grupo I):** Pacientes com história clínica de febre, exantema hemorrágico e achados do exame citológico das amostras de LCE compatíveis com meningite supurativa (≥ 500 céls/mm³; $\geq 50\%$ PMN).
- **Casos suspeitos de meningococemia (grupo II):** Pacientes com febre de início abrupto, exantema hemorrágico e contagem de leucócitos ≤ 100 céls/mm³ no LCE, ou sangue daqueles que não foram submetidos à punção lombar por não ter sido considerada segura.
- **Casos suspeitos de meningite meningocócica ou meningococemia com a bacterioscopia positiva (grupo III):** Pacientes com febre, exantema hemorrágico e bacterioscopia do LCE positiva, independente da celularidade.

A definição de caso de meningite com meningococemia é aquela adotada pelo Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde. Utilizou-se como critério de definição de meningococemia a contagem de leucócitos ≤ 100 céls/mm³ no LCE, conforme classificação descrita por Niklasson e cols. (1971). Neste estudo, ficou demonstrado que o prognóstico do grupo de pacientes com ≤ 100 céls/mm³ no LCE é igual ao grupo com ≤ 10 céls/mm³ e pior que no grupo com mais de 100 céls/mm³. Este critério foi mais adequado para o presente estudo, pois permitiu a inclusão de 10 casos que teriam sido excluídos se o critério clássico de meningococemia (leucócitos ≤ 10 céls/mm³ no LCE) tivesse sido utilizado. (Onorato

et al., 1980; Tarlow e Geddes, 1992). Os casos de meningite e/ou septicemia com exantema hemorrágico apresentando apenas a bacterioscopia positiva foram todos incluídos, a fim de se confirmar uma etiologia.

4.3 Critério de exclusão

- Foram excluídas amostras clínicas de pacientes com suspeita de doença meningocócica, quando uma bactéria foi detectada pela cultura (sangue ou LCE) ou pelo teste do látex (LCE).
- Foram excluídas ainda amostras de LCE com volume menor do que 200µl.

4.4 Ensaio da reação da polimerase em cadeia (PCR)

As amostras selecionadas (LCE e sangue) foram submetidas à extração do DNA bacteriano através da ferramenta *DNeasy Tissue Kit* (QIAGEN®), seguindo o protocolo para bactéria Gram positiva fornecido pelo fabricante, que permite a extração do DNA tanto de bactérias Gram positivas quanto Gram negativas.

Após extração do DNA, foi utilizado um multiplex PCR de triagem para a detecção de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* (capsulados), desenhado para a amplificação dos genes conservados *crgA*, *ply* e *bexA*, respectivos a cada uma das bactérias citadas (van Ketel *et al.* 1990, Taha, 2000, Corless *et al.*, 2001). Esses genes estão envolvidos com a adesão às células alvo (*crgA*), codificação da pneumolisina (*ply*) e no transporte dos polissacarídeos capsulares (*bexA*) (Tabela 3).

Tabela 3 Seqüência de bases utilizadas como iniciadores na reação de PCR para cada agente bacteriano e os respectivos tamanhos dos produtos amplificados.

Espécies	Genes	Iniciadores	Produto amplificado
<i>N. meningitidis</i>	<i>crgA</i>	5'-GCTGGCGCCGCTGGCAACAAAATTC-3' 5'-CTTCTGCAGATTGCGGCGTGCCGT-3'	230 pb
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Ply</i>	5'-TGCAGAGCGTCCTTTGGTCTAT-3' 5'-CTCTTACTCGTGGTTTCCAACCTTGA-3'	80 pb
<i>H. influenzae</i>	<i>bexA</i>	5'-GGCGAAATGGTGCTGGTAA-3' 5'-GGCCAAGAGATACTCATAGAACGTT-3'	343 pb

Para a determinação do sorogrupo utilizamos um multiplex PCR com oligonucleotídeos nos genes *siaD* (B, C, Y, W₁₃₅) e *orf-2* (A) ou um PCR para identificação individual de seqüências dos genes *ctrA* (29E, X, Z), necessários para a biossíntese dos polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* (Taha, 2000; Bennett *et al.*, 2004). Quando necessário outro ensaio de PCR foi utilizado para discriminar entre os sorogrupos Y e W₁₃₅, cujos produtos do PCR são iguais a 120 bp (Tabela 4).

Tabela 4 Sequências de bases utilizadas como iniciadores na reação de PCR para identificação dos sorogrupos de *N. meningitidis* e os respectivos tamanhos moleculares

Sorogrupos	Genes	Iniciadores	Produto amplificado
B	<i>siaD</i>	5'-GGATCATTTCAGTGTTTTCCACCA-3' 5'-GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA-3'	450 pb
C	<i>siaD</i>	5'-TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT-3' 5'-CAATCACGATTTGCCCAATTGAC-3'	250 pb
W ₁₃₅	<i>siaD</i>	5'-CAGAAAGTGAGGGATTTCCATA-3' 5'-CACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT-3'	120 pb
Y	<i>siaD</i>	5'-CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA-3' 5'-CTGAAGCGTTTTTCATTATAATTGCTAA-3'	120 pb
A	<i>orf-2</i>	5'-CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC-3' 5'-CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT-3'	400 pb
29E	<i>ctrA</i> <i>ctrA R</i>	5'-ATTACGCTGACGGCATGTGGA-3' 5'-TTGTCGCGGATTTGCAACTA-3'	667 pb
X	<i>ctrA</i> <i>ctrA R</i>	5'-GTCTTTGTATAAGGCCCAAG-3' 5'-TTGTCGCGGATTTGCAACTA-3'	525 pb
Z	<i>ctrA</i> <i>ctrA R</i>	5'-TATGCGGTGCTGTTTCGCTATG-3' 5'-TTGTCGCGGATTTGCAACTA-3'	667 pb

A reação de PCR (50 µl) continha 0,6 µM de cada *primer* de oligonucleotídeos (Invitrogen), 200 µM dNTPs, tampão de PCR, 3 mM MgCl₂, 1U platinun *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 10 µl de DNA alvo. A reação foi realizada em um termociclador (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems) nos seguintes parâmetros: 94°C por 3 minutos, 55°C por 30 segundos,

72°C por 20 segundos; seguido por 35 ciclos de 92°C por 40 segundos; 55°C por 30 segundos, 72°C por 20 segundos; 72°C por 10 minutos; e mantido a 4°C ∞. Os produtos amplificados pelo ensaio de PCR foram analisados através da eletroforese em gel de agarose padrão a 2% e visualizados sobre iluminação ultravioleta, após coloração pelo brometo de etídio.

O DNA extraído de cepas padrão (Nm ATCC 13090, Sp ATCC 49619 e Hib ATCC 10211) ou de isolados clínicos (Nm sorogrupos A, B, C, W₁₃₅, Y, 29E, X e Z) foi incluído em todas as reações como controle positivo e a mistura da reação sem DNA como controle negativo.

4.5 Banco de dados

As informações demográficas, epidemiológicas e clínicas dos casos incluídos foram obtidas através de consulta às fichas padronizadas (anexo 1) preenchidas para encaminhamento de amostras para o antigo Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz e, quando necessário, consultas aos livros de registros do laboratório do IEISS, prontuários médicos dos pacientes e fichas de notificação epidemiológica para a criação do banco de dados (.xls).

4.6 Considerações éticas

O presente estudo foi revisto e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (Protocolo – CEP nº 0005.0.009.000-07). Todos os aspectos éticos são devidamente contemplados no protocolo de investigação, seguindo as normas vigentes no Conselho Nacional de Saúde, em especial das Resoluções 196/96, 251/97 e 292/99.

5 RESULTADOS

Foram analisadas 76 amostras biológicas (LCE = 71; sangue = 5) de pacientes com doença meningocócica invasiva clinicamente diagnosticados, sem confirmação etiológica por cultura e detecção de antígeno. Destes, 39,5% (n = 30) foram classificados como grupo I (meningite com meningococemia), 25 % (n = 19) como grupo II (meningococemia) e 35,5% (n = 27) como grupo III (bacterioscopia positiva). A celularidade média do LCE foi de 5037 céls/mm³ (variando de 0 - 29,640/mm³); 24% tinham ≤ 100 céls/mm³ e 76% ≥ 500 céls/mm³. Do total, 54% tinham idade menor que 6 anos, com média de 12 anos (variando de 2 meses – 58 anos); 41% (n = 31) eram do sexo feminino e 59% (n = 45) do sexo masculino (Gráfico 10).

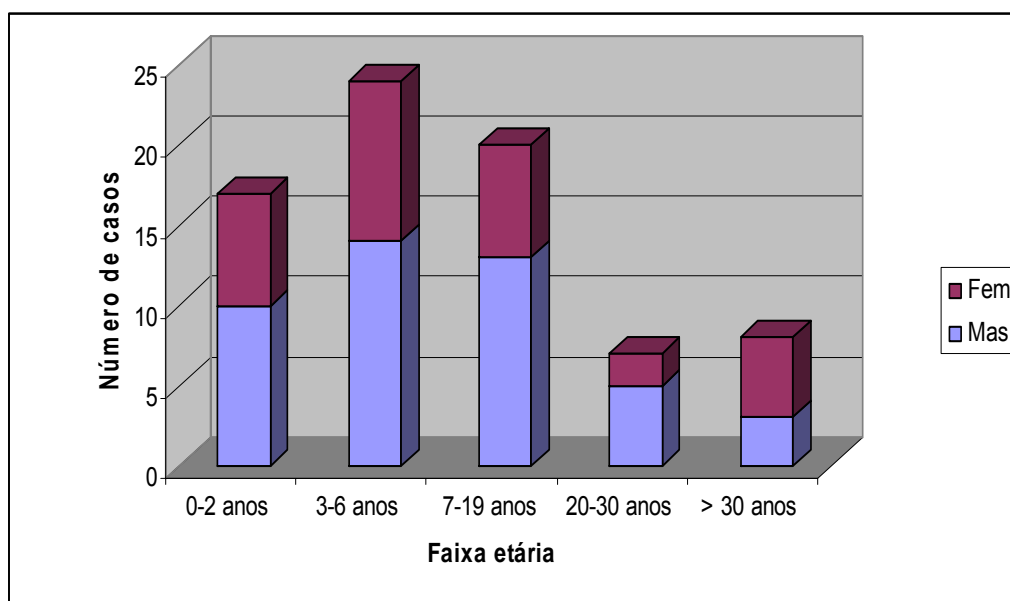


Gráfico 10 Distribuição dos casos estudados por faixa etária e sexo.

Das amostras estudadas, 70 amostras de LCE e 3 amostras de sangue foram positivas para a pesquisa de DNA de *N. meningitidis* pela reação de PCR (Figura 9). Das 70 amostras de LCE incluídas, todas que tiveram exame bacterioscópico positivo (n = 27) também foram positivas para pesquisa de *N. meningitidis* pela reação de PCR (Figura 10). Do total, três amostras foram negativas para a pesquisa dos três DNA alvos (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*). A técnica de PCR foi capaz de identificar o DNA bacteriano em 8 amostras de LCE obtidas após 24-48 horas do início de antibioticoterapia parenteral (ceftriaxona ou penicilina).

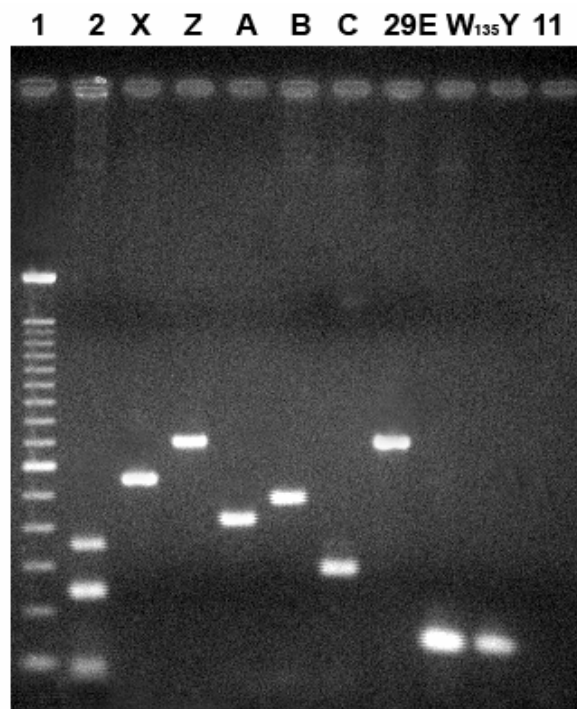


Figura 8 Linha 1: marcador de tamanho molecular (Invitrogen); 2: amplificação por meio do ensaio de PCR multiplex dos genes *bexA* (343 bp), *crgA* (230 bp) and *ply* (80 bp) de cepas padrão Hib ATCC 10211, Nm ATCC 13090 and Sp ATCC 49619, respectivamente; 3-10: amplificação por PCR de regiões específicas do gene *ctrA* (Z = 667 bp) de isolado clínico e resultados obtidos quando o ensaio foi aplicado às amostras biológicas, mostrando a detecção dos sorogrupos X (525 bp), A (400 bp), B (450 bp), C (250 bp), 29E (667 bp), W₁₃₅ (120 bp) e Y (120 bp); 11: controle negativo.

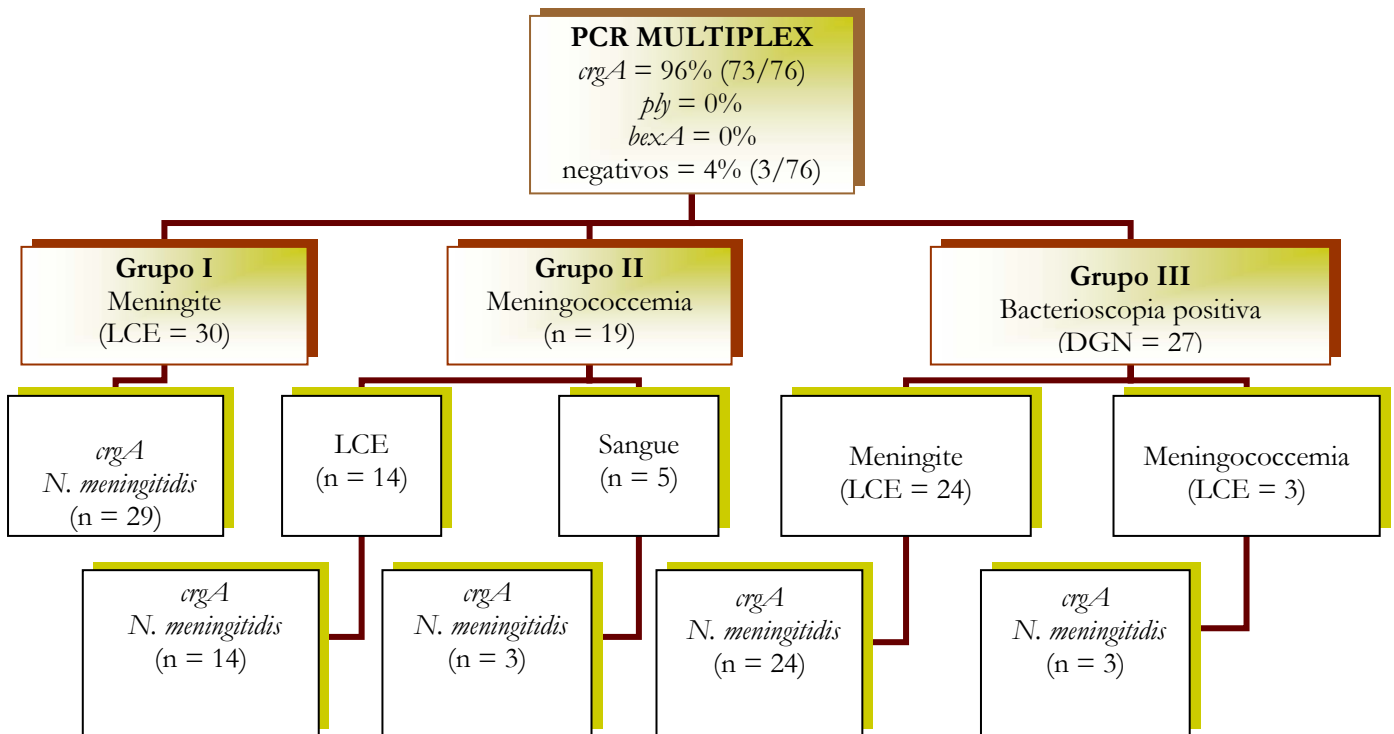


Figura 10 Organograma dos resultados do método de PCR multiplex aplicado para a detecção dos genes *crgA*, *ply* e *bexA*.

Em 82% das amostras positivas (58/71; 2 amostras perdidas) foi possível a identificação do sorogrupo pela técnica do PCR (Figura 11). Destas, 1 (2%) foi identificada como sorogrupo A, 35 (60%) como sorogrupo B, 4 (7%) como sorogrupo C, 2 (3%) como sorogrupo X, 1 (2%) como sorogrupo Y, 1 (2%) como sorogrupo 29E e 14 (24%) como sorogrupo W₁₃₅ (Gráfico 11).

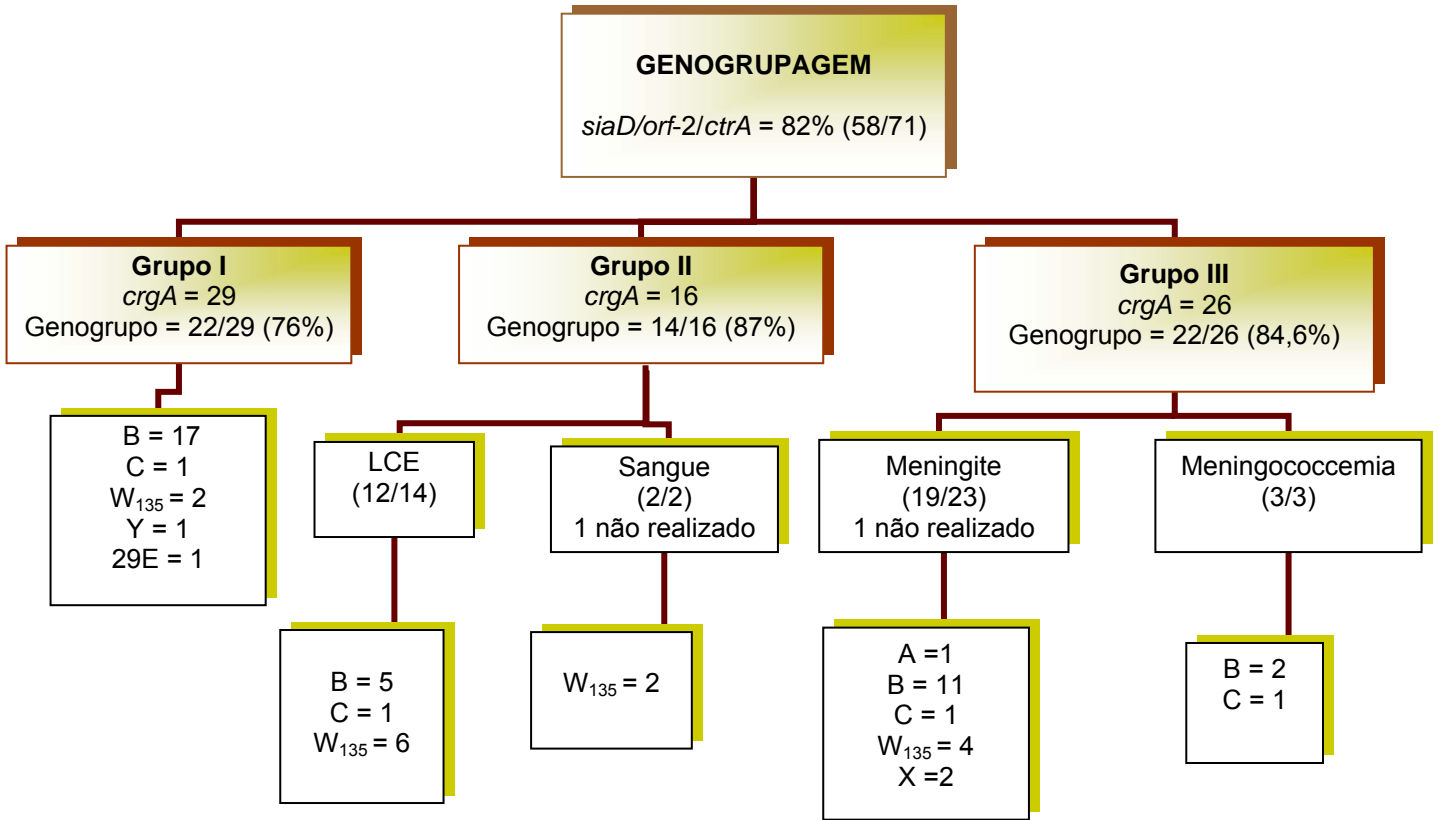


Figura 11 Organograma dos resultados do método de PCR aplicado para a determinação do genogrupo.

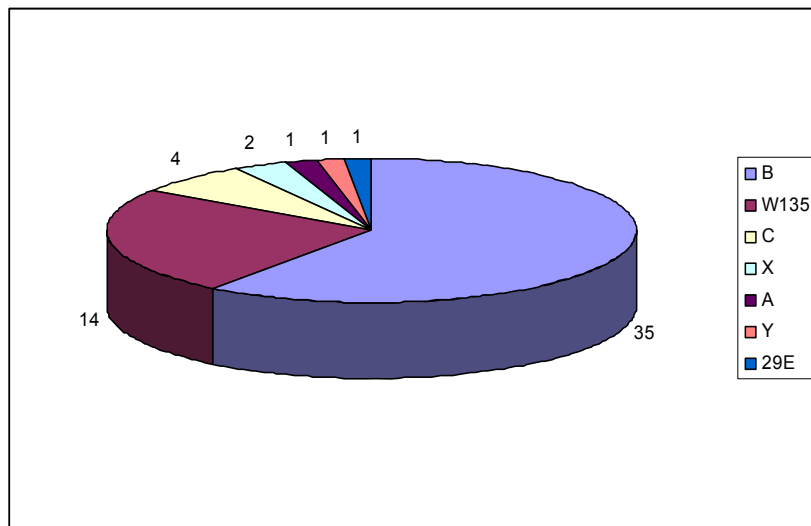


Gráfico 11 Distribuição dos sorogrupos de *N. meningitidis* na população estudada.

Dos 76 casos incluídos, 63 receberam alta e 10 evoluíram para óbito; 3 tiveram desfecho ignorado. Dos pacientes com desenlace conhecido a letalidade total foi de 14% (10/73), sendo de 3% (1/30) no grupo I, 22% (4/18; 1 evolução ignorada) no grupo II e 20% (5/25; 2 evoluções ignoradas) no grupo III. Do total, a letalidade foi de 7,7% em pacientes com meningite (4/52; 2 evoluções ignoradas) e de 28,6% em pacientes com meningococcemia sem meningite (6/21; 1 evolução ignorada).

6 DISCUSSÃO

O relato de Vieuseaux em Genebra, em 1805, é o marco oficial da história da meningite cérebro-espinhal epidêmica e também a primeira observação da associação entre meningite e púrpura (Vieuseaux, 1805). Desde então, lesões hemorrágicas cutâneas, um sinal de manifestação septicêmica, são reconhecidas como uma das características mais notáveis da doença invasiva por *N. meningitidis* (Toews e Bass, 1974; Darmstadt, 1998). Apesar de todo o desenvolvimento no diagnóstico e tratamento da doença desde a sua descrição, a doença meningocócica ainda representa uma importante causa de meningite e septicemia em várias regiões do mundo, principalmente em crianças, com altas taxas de letalidade e de seqüelas neurológicas permanentes. No Brasil, é a principal causa de meningite e septicemia de origem comunitária.

O principal fator de risco isolado para o adoecimento é a ausência de anticorpos bactericidas contra o sorogrupo infectante (Goldschneider *et al.*, 1969b; Goldschneider *et al.*, 1969a; Emonts *et al.*, 2003). Os anticorpos transferidos da mãe para o filho durante a gestação apresentam uma redução sérica gradativa ao longo do primeiro trimestre, o que confere uma maior susceptibilidade ao adoecimento de crianças a partir dos três meses até os dois anos de idade, período no qual são registradas as maiores taxas de ataque ajustadas para idade (Goldschneider *et al.*, 1969b). A partir dos dois anos de idade há uma tendência ao aumento da concentração de anticorpos bactericidas em resposta à infecção assintomática, pelo meningococo ou por *Neisseria* comensal (p.ex., *N. lactamica*), concomitante a uma tendência de queda das taxas de incidência. Na população estudada nesse estudo,

22,4% dos casos ocorreram em crianças < 2 anos e 31,6% em crianças entre 3-6 anos, perfazendo um total de 54% dos casos neste grupo etário. A distribuição por sexo seguiu o padrão relatado mundialmente, com discreto predomínio no sexo masculino (59%), mas quando é feita estratificação por idade, observa-se um predomínio do sexo feminino a partir dos 30 anos de idade (62,5%) (Beeson e Waterman, 1943).

A infecção por *N. meningitidis* produz uma grande variedade de manifestações, que vão desde a forma assintomática até a septicemia fulminante. A maioria dos indivíduos infectados não desenvolve doença invasiva, se tornando apenas portadores assintomáticos de *N. meningitidis* na nasofaringe, o que permite a manutenção e a disseminação da bactéria na população (Palmer *et al.*, 1992). Uma vez que a bactéria alcança a corrente sanguínea, a maioria dos casos diagnosticados de doença meningocócica manifesta-se como meningite e/ou septicemia (meningococcemia). Todos os doentes deste estudo apresentavam exantema hemorrágico, seguindo o critério de inclusão, e foram classificados como meningite com septicemia (71%) ou septicemia isolada (29%). Na região de Mersey, Inglaterra, cerca de 90% dos casos desenvolveram ambas ou uma destas manifestações clínicas; a proporção dos casos de meningite, meningite com septicemia e septicemia foi de 12%, 62% e 26%, respectivamente (Hart e Rogers, 1993). No Rio de Janeiro, em um estudo realizado por Barroso (1998), 30% dos pacientes foram classificados como meningite, 58% como meningite com septicemia e 12% como septicemia. O total de formas clínicas causadas por *N. meningitidis* não é conhecido, tanto pela falta de notificação quanto, principalmente, pela falta de pesquisa de uma etiologia.

É importante levar em consideração que a doença meningocócica não se

apresenta primariamente como meningite. A maioria das mortes é decorrente da septicemia e a proporção de crianças com septicemia tem aumentado desde a segunda metade da década de 1990 (Pollard *et al.*, 1999; Kaplan *et al.*, 2006). O exantema e o enantema são aspectos comuns da infecção meningocócica invasiva, os quais surgem no primeiro ou segundo dia de doença, podendo ser maculopapular, petequial, ou equimótico. Contudo, o aspecto hemorrágico é o mais freqüente (Toews e Bass, 1974). A sua presença indica a ocorrência de septicemia, que pode ou não estar associada à meningite. Em áreas endêmicas de doença meningocócica, a presença de exantema hemorrágico em crianças com doença febril aguda é muito sugestivo de doença invasiva por *N. meningitidis* (Hart e Rogers, 1993; Barroso *et al.*, 2002). A associação de exantema hemorrágico e meningite é raramente observada com as outras etiologias comuns de meningite bacteriana aguda (Greenwood, 1991).

De acordo com a Secretaria de Saúde do Estado, a letalidade da doença meningocócica no Rio de Janeiro no período de 2000 a 2005 foi de 22% (578/2618), o que está acima do esperado. Este cenário sugere problemas com o manejo inicial destes pacientes e, provavelmente, uma falha em diagnosticar os casos mais leves, sem manifestações cutâneas hemorrágicas. Indica também a necessidade de se fazer uma reavaliação dos protocolos de atendimento inicial dos casos suspeitos de meningite bacteriana e de se investigar a percepção dos médicos em relação à doença meningocócica. Estas questões são particularmente críticas, pois com freqüência os pacientes eram encaminhados ao antigo IEISS sem o suporte mínimo e muitas vezes sem que se tenha iniciado o antibiótico e a hidratação venosa. Alguns casos inclusive chegavam ao IEISS por meios próprios, em geral, em transporte coletivo, com encaminhamento médico ao centro de referência com a

suspeita clínica de doença meningocócica. Tal conduta reflete o desconhecimento da gravidade da doença e do seu caráter rapidamente progressivo e a falta de estrutura das unidades básicas de saúde para o encaminhamento adequado dos pacientes para os hospitais de referência.

A presença de púrpura, especialmente quando disseminada, é reconhecida como um sinal de mau prognóstico imediato na doença meningocócica (Toews e Bass, 1974). Esta manifestação decorre da liberação de endotoxinas durante a multiplicação do meningococo na circulação sangüínea, que desencadeia uma série de distúrbios no equilíbrio das atividades anti e pró-coagulantes das células endoteliais (Darmstadt, 1998). No Estado do Rio de Janeiro de 2000 a 2005, a letalidade dos casos suspeitos (diagnóstico clínico), que necessariamente apresentam exantema hemorrágico como critério de definição, foi significativamente superior comparado aos casos confirmados, que incluem tanto pacientes com septicemia (com ou sem meningite) quanto meningite isolada (sem exantema). Este fato está relacionado a vários fatores como uma menor chance antes do início do tratamento de coletar material para diagnóstico dos casos mais graves, falta de percepção sobre a etiologia meningocócica, ausência de uma abordagem sindrômica para as febres hemorrágicas urbanas, a disseminação equivocada do conceito e dos sinais de gravidade do “dengue hemorrágico”, o que leva a retardo e a erro diagnóstico fatais. Nesse estudo, todos os casos incluídos tinham exantema hemorrágico, mas os casos sem meningite apresentaram uma letalidade maior que os casos com meningite supurativa associada. Conforme demonstrado anteriormente, a ausência de meningite é um fator reconhecido de pior prognóstico e o critério de celularidade do LCE < 100 céls/mm³ parece se correlacionar bem com uma maior gravidade e um pior prognóstico (Niklasson *et al.*, 1971).

O resultado deste trabalho mostra que o quadro de febre associada a um exantema hemorrágico, especialmente em crianças, é fortemente sugestivo de doença meningocócica invasiva, na população do Rio de Janeiro. Desta forma, o critério clínico de doença meningocócica, que é definido pelo Ministério da Saúde e utilizado em todo o País, está apropriado para aplicação na área metropolitana do Rio de Janeiro. Entretanto é necessário manter uma vigilância constante da doença meningocócica, com confirmação do maior número de casos possível, pois a adoção das medidas de controle nos contactantes próximos depende do diagnóstico do caso índice, e adicionalmente, para a implementação da vacinação de bloqueio é necessária a identificação do sorogrupo circulante.

Além disto, algumas doenças, com manifestação e evolução semelhantes à doença meningocócica, podem ter tratamentos diferentes e necessitar de medidas de controle específicas. Igualmente, os sinais de mau prognóstico podem ser comuns. As septicemias ou meningites bacterianas de outras etiologias, especialmente por *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, embora menos freqüentemente, podem cursar com exantema hemorrágico indistinguível da doença meningocócica e a utilização de corticóide pode estar indicada como terapia adjuvante (van de Beek *et al.*, 2007). Embora a febre purpúrica brasileira deva ser considerada no diagnóstico diferencial, desde 1993 não é registrado nenhum caso novo da doença no País (Harrison *et al.*, 2008). As infecções por enterovírus podem, inicialmente, se apresentar com quadro clínico semelhante à doença meningocócica, mas em geral a evolução é menos grave e não necessitam de tratamento específico (Grist *et al.*, 1978; Rorabaugh *et al.*, 1993). O dengue, doença epidêmica no Brasil, pode evoluir com choque, tendência a sangramentos, principalmente do trato gastrointestinal e, eventualmente, exantema hemorrágico (principalmente petéquias); entretanto o

diagnóstico diferencial pode ser feito de forma inequívoca através da história clínica, observando-se o tempo de evolução da doença (Halstead, 2007). Um registro de letalidade de dengue acima do esperado ($> 1\%$) deve servir de alerta para a possibilidade de casos de doença meningocócica estarem sendo erroneamente tratados como dengue. A febre maculosa brasileira, uma doença própria das áreas rurais, também pode evoluir com aparecimento de exantema hemorrágico a partir do terceiro dia de doença, sendo portanto de aparecimento mais tardio (e.g., entre o 4°-6° dia) do que na doença meningocócica (Belman, 1999). A suspeição do diagnóstico é essencial para o tratamento antimicrobiano adequado, uma vez que o cloranfenicol não é prescrito sem uma indicação precisa. Recentemente, foi relatado um caso adquirido na cidade do Rio de Janeiro, após um período de três décadas sem notificação de casos em áreas urbanas (Lamas *et al.*, 2008). Portanto, este diagnóstico deve ser considerado em todos os pacientes com quadro febril agudo que tenham tido possibilidade de exposição a carrapatos.

O diagnóstico inicial da doença meningocócica é fundamentalmente clínico. Na septicemia meningocócica o exantema hemorrágico costuma ser disseminado, e mesmo após a instituição imediata de antibiótico a evolução é rapidamente progressiva com um desfecho fatal. Portanto, para se ter um impacto significativo na letalidade da meningococemia é preciso reconhecer a doença antes do aparecimento do exantema hemorrágico, o que muitas das vezes é impossível. Um estudo realizado por Thompson e cols. (2006) mostrou que dor em membros inferiores, extremidades frias, sede (em crianças maiores) e pele mosqueada foram as manifestações clínicas mais precoces de septicemia em pacientes com doença meningocócica. Neste estágio, isto significa que não é possível dizer se estamos frente a um casos de meningite ou septicemia, mas que uma doença grave pode

estar em curso. Febre associada a sinais clínicos precoces de gravidade (nas primeiras 8-48 horas), seguida de evolução rápida (em poucas horas) com púrpura e choque, são elementos de convicção para a suspeição diagnóstica de meningococemia. Eventualmente, podem estar presentes ao longo da evolução da doença sinais de irritação meníngea, que corroboram fortemente o diagnóstico clínico de meningite meningocócica com septicemia.

Em casos suspeitos de doença meningocócica, o início imediato do tratamento é absolutamente essencial para o sucesso terapêutico, particularmente das formas com púrpura. Entretanto, a confirmação laboratorial dos casos de meningite e/ou febre com exantema hemorrágico é fundamental para apoiar as ações de controle nos contactantes próximos e na comunidade. O método tradicional de identificação de patógenos por meio da cultura é um elemento chave para o estabelecimento da relação causal entre uma determinada doença e um microorganismo específico. Entretanto, vários agentes infecciosos não sobrevivem durante o transporte, são exigentes quanto às condições de cultivo, o seu crescimento é lento, ou não são cultiváveis. Nos casos suspeitos de doença meningocócica ou de meningite bacteriana a sensibilidade dos métodos tradicionais de diagnóstico laboratorial é reduzida quando as amostras clínicas não são coletadas antes do tratamento específico ou há demora em seu processamento. Mesmo um período curto de tempo entre a administração do antibiótico e a coleta do LCE, de 15 minutos a 2 horas, já interfere de forma significativa com o rendimento dos métodos (Kanegaye *et al.*, 2001).

A presença de DGN na bacterioscopia do LCE, embora seja aceito como critério para a confirmação diagnóstica de meningite meningocócica no Brasil e pela OMS, a presença de diplococos Gram positivos ou de bastonetes (Gram positivo ou

negativo) não é considerada isoladamente como critério diagnóstico para a confirmação de caso (MSB, 1994). No presente estudo, o exame bacterioscópico positivo do LCE, isoladamente, não serviu como critério para a definição de caso confirmado e estas amostras não foram excluídas, pois houve o interesse em confirmar a etiologia bacteriana e identificar o sorogrupo.

A detecção de antígenos no LCE por métodos imunológicos, como a aglutinação pelo látex, parece não aumentar de forma significativa o percentual de casos confirmados, pois tem sensibilidade baixa nos casos em que a cultura é negativa (Tarafdar *et al.*, 2001; Nigrovic *et al.*, 2004). Além disto, existe uma restrição para a detecção individualizada dos diferentes sorogrupos, pois o kit utilizado no laboratório de referência de meningites no Estado do Rio de Janeiro identifica em conjunto sorogrupos A/Y, C/W₁₃₅, B/*E.coli* K1 (BD Directigen Meningitis Combo Test).

Diante da dificuldade de se estabelecer o diagnóstico da doença meningocócica em locais de difícil acesso ou com recursos limitados, Chanteau *et al.* (2006) desenvolveram um método rápido de diagnóstico baseado na identificação de polissacarídeos da membrana de *N. meningitidis* por imunocromatografia para os sorogrupos A, W₁₃₅, C e Y. Este método, que pode fornecer o resultado em até 15 minutos após a coleta do LCE, o qual foi testado no Níger e apresentou sensibilidade e especificidade de 93,8% e 97,1% para o sorogrupo A, respectivamente; e de 100% e 99,4% para o sorogrupo W₁₃₅, considerando um limite de detecção de 1ng polissacarídeo/ml (equivalente a 10⁵ UFC/ml). Entretanto neste estudo, o número de casos de sorogrupo C incluídos foi muito pequeno, não permitindo a avaliação de sensibilidade para este sorogrupo. Além disto, o método não foi testado para o sorogrupo B, que é uma importante causa de doença na

Europa e no Continente Americano. Adicionalmente, a positividade do teste depende de uma concentração bacteriana elevada no LCE, nem sempre presente, principalmente nos casos mais graves de septicemia ou nos pacientes que receberam antibiótico prévio. Portanto, a aplicação do teste rápido atualmente disponível não parece ser útil para utilização fora do contexto africano.

Nas últimas décadas, o avanço na microbiologia molecular diagnóstica reduziu o tempo necessário para identificação dos microorganismos patógenos humanos. A utilização de ensaios de PCR teve um impacto importante no diagnóstico das doenças infecciosas, cuja sensibilidade é bem maior da aquela dos ensaios de *microarray*. A capacidade do método de amplificar quantidades ínfimas de seqüências específicas de DNA de um microorganismo é um instrumento diagnóstico poderoso. A positividade dos métodos laboratoriais tradicionais, utilizados de rotina para a confirmação diagnóstica, depende de uma concentração bacteriana muito maior que a necessária para confirmação através do ensaio de PCR.

O advento de métodos moleculares para o diagnóstico de meningite, que independem da viabilidade do microorganismo, aumentou de forma considerável a possibilidade de confirmação de casos suspeitos, mesmo após o início do tratamento, e já são utilizados rotineiramente em vários países da Europa e África. No estudo realizado por Ragunathan *et al.*, foi demonstrada a detecção de DNA bacteriano pelo ensaio de PCR em espécimes de LCR obtidos até 72h após o início de antibióticos (Ragunathan *et al.*, 2000). Bronska *et al.* (2006) detectaram DNA de *N. meningitidis* no LCR de pacientes até o 7º dia após início do antibiótico. Bryant *et al.* (2004) demonstrou a presença de DNA de *N. meningitidis* no sangue de 1/3 dos pacientes com doença meningocócica até 72h após o início da antibioticoterapia.

Neste estudo, a técnica de PCR foi capaz de identificar o DNA bacteriano em 8 amostras de LCE obtidas após 24-48 horas do início de antibioticoterapia parenteral (ceftriaxona ou penicilina). Apesar disto tudo, está estabelecido como recomendação de que as amostras de LCE sejam coletadas até 72 horas e as de sangue até 4 horas após o início do tratamento específico (Taha e Olcen, 2004).

Além do grande impacto no diagnóstico, a utilização de métodos moleculares permitiu um melhor entendimento da epidemiologia das doenças infecciosas, que anteriormente era baseada apenas em características fenotípicas. Desde a década de 1980, com o rápido desenvolvimento da biologia molecular, se tornou evidente que o mesmo microorganismo pode expressar fenótipos variados de acordo com a pressão seletiva do meio. Os métodos moleculares permitiram a identificação de clones de cepas descendentes de um mesmo ancestral mesmo abrigando mudanças do fenótipo original e o reconhecimento da plasticidade genômica resultante de mecanismos diversos, como variação de fase, mutação e recombinação alélica (Taha e Alonso, 2008).

O ensaio de PCR utilizado neste estudo se mostrou uma ferramenta útil para o diagnóstico e a vigilância epidemiológica de casos suspeitos de doença meningocócica na população do Rio de Janeiro. A maioria dos casos notificados de doença meningocócica no Estado, entre 2000 a 2005, foi baseada apenas em critérios clínicos sem confirmação da etiologia por técnicas laboratoriais. O percentual de casos confirmados laboratorialmente está abaixo do esperado. Provavelmente, esta tendência é conseqüência de vários fatores como utilização precoce de antibiótico, retardo da realização da punção lombar, descentralização do atendimento, falta de recursos básicos e de pessoal técnico qualificado, transporte inadequado do material para o laboratório de referência e o processamento

subótimo dos espécimes clínicos, devido à falta de métodos que identifiquem sorogrupos “infreqüentes”. Na grande maioria das vezes, as amostras de LCE são encaminhadas ao laboratório do IEISS em frascos de vidro estéreis acondicionados em isopor com gelo, o que permite a melhor conservação da celularidade da amostra; contudo, esta prática reduz a sensibilidade dos métodos laboratoriais que dependem da viabilidade dos microorganismos que causam meningite, como a cultura e a bacterioscopia. Além disto, em muitos laboratórios, a centrifugação das amostras de LCE não é realizada de rotina antes da semeadura em meio de cultura e da bacterioscopia – procedimento que poderia contribuir para o aumento da sensibilidade dos métodos laboratoriais tradicionais. Outro problema é o transporte das amostras em frasco de vidro, o que reduz a celularidade devido à adesão à superfície de vidro. Uma forma de minimizar este problema é o acondicionamento do LCE em frasco de plástico, o que reduz a perda de leucócitos (Knight e Kjeldsberg, 2007).

Nestas circunstâncias e com a dificuldade cada vez maior de se manter um centro de referência no Estado para o diagnóstico e tratamento das meningites agudas, parece não haver, em curto prazo, perspectiva de aumento do número de casos confirmados, o que interfere de forma significativa na vigilância epidemiológica e no controle da doença. A utilização de PCR para o diagnóstico de meningites agudas pelos laboratórios centrais (LACEN) poderia, em parte, contornar algumas dificuldades relacionadas aos métodos laboratoriais tradicionais, como a redução da sensibilidade com o uso prévio de antibiótico e com as condições de transporte do material, visto que estes fatores não interferem com o rendimento do método molecular. A utilização de PCR multiplex para a identificação dos principais agentes etiológicos das meningites bacterianas permite o diagnóstico rápido, em até 5 horas,

e simultâneo em um único tubo. O custo por extração utilizando o protocolo deste estudo foi de cerca de R\$ 12,30 (kit 250 reações, ponteiras, tubo eppendorf™). Uma vez instalada a infra-estrutura para a realização do PCR, o custo por reação (controle (+), controle (-), amostra teste), levando-se em consideração apenas o gasto com reagentes e material descartável, é de aproximadamente R\$ 25,62. Enquanto o processo de revelação (gel de agarose, brometo de etídio, marcador de tamanho molecular, ponteira, azul de bromofenol) está estimado em R\$ 4,00.

A positividade do método de PCR para *N. meningitidis* utilizado neste estudo foi excelente, o que provavelmente está também relacionada ao processo utilizado para extração do DNA dos espécimes clínicos (*DNeasy Tissue Kit*®), que é superior ao método de fervura. No entanto, o ensaio de PCR falhou em detectar o DNA bacteriano em uma amostra de LCE e duas amostras de sangue. Uma possibilidade para o resultado negativo pode ser a baixa concentração bacteriana nestas amostras. Alternativamente, a falha em detectar o DNA bacteriano pode estar relacionada à presença de substâncias inibidoras da reação nas amostras. A amostra negativa para pesquisa de *N. meningitidis* por PCR no LCE foi de um caso compatível com meningite supurativa, com 5800 céls/mm³ (100% polimorfonuclear), de uma criança de dois anos internada no IEISS, sem relato de antibioticoterapia prévia. A amostra do LCE também foi negativa para pesquisa de DNA por PCR para *S. pneumoniae* e *H. influenzae*. As duas amostras de sangue negativas para a pesquisa de *N. meningitidis* por PCR provavelmente foram falsos negativos, pois os casos tinham relação temporal com quatro casos incluídos neste estudo, com diagnóstico de doença meningocócica invasiva causada pelo sorogrupo W₁₃₅. Estas amostras foram coletadas de casos suspeitos de doença meningocócica relacionados a um surto de doença febril hemorrágica na região metropolitana do

Rio de Janeiro em 2004 (Barroso, dados não publicados). A confirmação do surto de doença meningocócica e a identificação do sorogrupo circulante só foram possíveis através da utilização de métodos moleculares de amplificação do ácido nucléico. Até onde sabemos, esta é a primeira observação de surto relacionado ao sorogrupo W₁₃₅ na América Latina.

A técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) permite a amplificação, detecção e quantificação do material genético presente no espécime clínico de forma simultânea. Entretanto, este método é mais caro do que a técnica convencional, a sensibilidade e especificidade são similares, não identifica os sorogrupos, seu uso de rotina é restrito (Corless *et al.*, 2001). A técnica de RT-PCR exige um termociclador especial e reagente próprio, no qual existem ópticas de precisão que captam a emissão de fluorescência diretamente no poço onde ocorre a reação. Para isso, são utilizados corantes fluorescentes que se ligam preferencialmente a fitas duplas de DNA, corando, portanto, os produtos de amplificação. A técnica em tempo real diminui o tempo necessário para a realização do ensaio (Uzuka *et al.*, 2004), mas a introdução desta técnica em laboratórios públicos de análises clínicas no Brasil parece uma possibilidade ainda mais remota. O ensaio de PCR convencional parece ser uma solução satisfatória para ser implementada a nível central nos laboratórios de referência localizados em cada estado, onde os procedimentos laboratoriais diagnósticos para a maioria das doenças infecciosas estão concentrados.

A identificação dos sorogrupos por meio de ensaios de PCR é um recurso essencial para o estudo da epidemiologia da doença meningocócica em uma população e para o planejamento das ações de controle. A sensibilidade relatada na literatura do método de PCR para identificação dos sorogrupos é de cerca de 73%

(Taha *et al.*, 2005). No presente estudo, utilizando-se iniciadores para identificação de seqüências nos genes *siaD* (B, C, Y, W₁₃₅), *orf-2* (A) e *ctrA* (29E, X, Z), foi possível identificar os sorogrupos em 82% das amostras examinadas. Na população estudada, observamos um predomínio do sorogrupo B, que é atualmente o sorogrupo mais freqüente no Brasil. Além disto, a sensibilidade dos *kits* de látex para o sorogrupo B é mais baixa que para os outros sorogrupos em geral, o que contribuiu para um maior número de casos de sorogrupo B incluídos nesse estudo.

O segundo sorogrupo mais freqüente, neste estudo, foi o W₁₃₅, que vem apresentando aumento significativo nos últimos anos no Rio de Janeiro (Barroso e Rebelo, 2007), seguindo a tendência de várias regiões do mundo. Isto vem acontecendo apesar do baixo número de casos confirmados por cultura, além da falta na rotina de um método indireto capaz de identificá-lo, indicando que a doença invasiva pelo sorogrupo W₁₃₅ não se trata mais de um fenômeno raro. O sorogrupo W₁₃₅ que, até recentemente, era considerada uma causa rara de doença meningocócica no mundo, emergiu na segunda metade dos anos de 1990 como causa de doença esporádica, surtos localizados e epidemias na África e Península Arábica, seguida de disseminação intercontinental de alguns clones deste sorogrupo (Pollard *et al.*, 2004). No Brasil no período de 1988 a 2002, apenas 0,3% dos casos de doença meningocócica eram causados pelo sorogrupo W₁₃₅. De 2003 a 2005, foram diagnosticados 43 casos de doença invasiva pelo sorogrupo W₁₃₅, que representou cerca de 11% dos casos confirmados. Atualmente, as cepas do sorogrupo W₁₃₅ e parte das cepas do sorogrupo C isoladas de pacientes no Rio de Janeiro expressam o mesmo fenótipo de clones associados com os surtos relacionados ao Hajj, identificada como W₁₃₅:2a:P1.5, 1.2 – ST 11 (Barroso e Rebelo, 2007).

A utilização de métodos que permitem a confirmação de maior número de casos contribui para identificação de sorogrupos pouco freqüentes e aponta para a necessidade de uma vigilância constante do perfil epidemiológico da doença no País para que as medidas de controle adotadas sejam eficazes. Até a presente data, a única vacina que confere proteção contra o sorogrupo W_{135} – a vacina antimeningocócica tetravalente (A+C+Y+W₁₃₅) - não tem registro na Agência de Vigilância e Saúde (ANVISA), por isto não pode ser importada para o Brasil. A vacina polissacarídica, que já era utilizada desde 1978, mais recentemente (2005) foi conjugada a partículas protéicas que, a exemplo de outras vacinas conjugadas (e.g. *H. influenzae* tipo B), conferem proteção mais prolongada, provavelmente permanente, e têm boa resposta em menores de 2 anos (Stephens, 2007). Portanto, nos dias atuais, com o advento da vacina conjugada antimeningocócica A+C+Y+W₁₃₅, a doença meningocócica deve ser considerada uma doença imunoprevenível, com exceção da doença causada pelo sorogrupo B.

A vacina tetravalente está indicada para viajantes que se dirigem para áreas de risco elevado de doença meningocócica (e.g. cinturão da meningite na África) e é obrigatória para concessão de visto de entrada na Arábia Saudita para os peregrinos em direção à Meca, durante o Hajj. Além disto, esta indicada para controle de surtos relacionados aos sorogrupos presentes na vacina. Outro sorogrupo - também contido na vacina tetravalente – que vem apresentando incidência crescente em várias regiões do mundo é o Y. Nos Estados Unidos, atualmente, cerca de um terço dos casos é causada por este sorogrupo e na Colômbia o sorogrupo Y foi responsável por 50% dos casos em 2006 (Connolly e Noah, 1999; Rosenstein *et al.*, 1999; Ines Agudelo *et al.*, 2008). O sorogrupo Y causa doença invasiva mais freqüentemente em adolescentes e adultos, o que pode ter impacto importante na

disseminação da doença devido à ampla rede de contato social desta população. No Rio de Janeiro, este sorogrupo ainda é pouco freqüente.

Não existe nenhuma vacina licenciada nos Estados Unidos e Europa para a prevenção da doença meningocócica causada pelo sorogrupo B, embora este seja um sorogrupo importante em todo Continente Americano e Europeu. O polissacarídeo do sorogrupo B é fracamente imunogênico nos seres humanos devido à similaridade da estrutura imunoquímica da cápsula bacteriana com glicoproteínas de ácidos polisiálicos que revestem as bainhas nervosas. A vacina antimeningocócica subcapsular B+C, produzida em Cuba, é comercializada em cerca de 19 países, principalmente na América Latina. Esta vacina é constituída por vesículas de membrana externa, preparada a partir da cepa B:4,7:19,15 (CU 385). A imunidade produzida é específica para esta cepa e a eficácia é de cerca de 57% a 83% em crianças e adultos, respectivamente. Em crianças abaixo de quatro anos, que é a faixa etária mais acometida pela doença invasiva, a vacina não se mostrou eficaz (Jodar *et al.*, 2002; Granoff *et al.*, 2004).

A implementação da técnica de PCR de rotina permitiria a confirmação da maioria das etiologias de meningite bacteriana e a identificação do sorogrupo da *N. meningitidis* e *H. influenzae* circulantes. Também poderia ser uma ferramenta valiosa para aumentar a vigilância da doença meningocócica em outras comunidades, especialmente em áreas remotas como na região Amazônica, onde há uma incidência significativa de febres hemorrágicas e dificuldade de acesso a laboratórios de microbiologia confiáveis. A identificação do sorogrupo de *N. meningitidis* circulante é fundamental para a vigilância e controle da doença. Com exceção do sorogrupo B, a imunização é baseada em antígenos capsulares presentes em qualquer das vacinas disponíveis (Barroso *et al.*, 2002; Harrison,

2006). Em situações de surto, quando apenas um pequeno número de casos é confirmado com o sorogrupo identificado, a vacinação de bloqueio pode não ser totalmente efetiva, pois a diversidade antigênica das cepas circulantes pode estar subestimada (Pollard *et al.*, 2004). As informações obtidas através da utilização de técnicas de biologia molecular podem contribuir de forma significativa para a abordagem de pacientes, contactantes próximos e, em situações especiais, de toda a população.

Embora a contribuição da biologia molecular seja inquestionável para o diagnóstico da doença meningocócica, ainda não pode substituir a cultura que é o único exame, até os dias atuais, que permite a determinação de forma inequívoca do padrão de sensibilidade dos microorganismos aos antibióticos. *N. meningitidis* não parece ser uma bactéria muito eficiente no desenvolvimento de resistência aos agentes antimicrobianos e permanece sensível aos antibióticos classicamente utilizados para tratamento e quimioprofilaxia, com exceção das sulfonamidas (Vazquez *et al.*, 2007).

Entretanto, em meados de 1980, algumas cepas com sensibilidade reduzida à penicilina foram descritas. Desde então, a frequência destas cepas com sensibilidade intermediária à penicilina vem aumentando em vários países; embora o grau de resistência permaneça estável, com a maioria dos isolamentos de *N. meningitidis* apresentando concentração inibitória mínima de 0,12 a 0,25 µg/mL. A resistência cruzada da penicilina com as cefalosporinas de terceira geração não está descrita e a correlação entre a redução da susceptibilidade da penicilina G e uma cefalosporina de amplo espectro nunca foi estabelecida (Vazquez *et al.*, 2007). Entretanto, a vigilância constante da tendência da susceptibilidade do meningococo a este grupo de antibióticos β-lactâmicos é fundamental, pois estas são as drogas de

primeira linha para o tratamento da doença invasiva. Devido à gravidade e à rápida evolução da doença meningocócica invasiva é essencial o monitoramento das alterações do perfil de sensibilidade de *N. meningitidis* aos antimicrobianos. Alguns trabalhos já apontam para a possibilidade de identificação do perfil de sensibilidade do meningococo a alguns antibióticos através de PCR, o que certamente poderá contribuir para a vigilância do desenvolvimento de resistência de *N. meningitidis* aos principais grupos de antimicrobianos (Taha *et al.*, 2006).

7 CONCLUSÕES

- O ensaio de PCR se mostrou uma ferramenta auxiliar útil para o diagnóstico de casos suspeitos de doença meningocócica, quando uma etiologia não foi definida pelos métodos laboratoriais tradicionais.
- Febre associada a exantema hemorrágico, especialmente em crianças, ficou fortemente associada a uma etiologia meningocócica na população deste estudo.
- A inclusão do método de PCR para o diagnóstico das principais etiologias de meningite bacteriana aumenta o número de casos confirmados com o sorogrupo determinado.
- A antibioticoterapia prévia parece não afetar a sensibilidade do ensaio de PCR, com o DNA alvo detectado mesmo em espécimes coletados até 48 horas após o início do tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achtman M. Clonal spread of serogroup A meningococci: a paradigm for the analysis of microevolution in bacteria. *Mol Microbiol.* 1994 Jan; 11(1):15-22.
- Adem PV, Montgomery CP, Husain AN, Koogler TK, Arangelovich V, Humilier M, *et al.* *Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse-Friderichsen syndrome in children. *N Engl J Med.* 2005 Sep 22; 353(12):1245-1251.
- Almeida G. Doenças epidêmicas e sua apresentação no Rio de Janeiro. *Rev Méd Cirúr do Brasil.* 1921; 29:449-475.
- Amir J, Harel L, Frydman M, Handsher R, Varsano I. Shift of cerebrospinal polymorphonuclear cell percentage in the early stage of aseptic meningitis. *J Pediatr.* 1991 Dec; 119(6):938-941.
- Andersen J, Berthelsen L, Bech Jensen B, Lind I. Dynamics of the meningococcal carrier state and characteristics of the carrier strains: a longitudinal study within three cohorts of military recruits. *Epidemiol Infect.* 1998 Aug; 121(1):85-94.
- Andersen J, Berthelsen L, Lind I. Measurement of antibodies against meningococcal capsular polysaccharides B and C in enzyme-linked immunosorbent assays: towards an improved surveillance of meningococcal disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997 May; 4(3):345-351.
- Angyo IA, Okpeh ES. Changing patterns of antibiotic sensitivity and resistance during an outbreak of meningococcal infection in Jos, Nigeria. *J Trop Pediatr.* 1998 Oct; 44(5):263-265.
- Archibald LK, Pallangyo K, Kazembe P, Reller LB. Blood culture contamination in Tanzania, Malawi, and the United States: a microbiological tale of three cities. *J Clin Microbiol.* 2006 Dec; 44(12):4425-4429.
- Avner ED, Satz J, Plotkin SA. Letter: Hypoglycorrachia in young infants with viral meningitis. *J Pediatr.* 1975 Nov; 87(5):833-834.

- Baker RC, Seguin JH, Leslie N, Gilchrist MJ, Myers MG. Fever and petechiae in children. *Pediatrics*. 1989 Dec; 84(6):1051-1055.
- Band RA, Gaieski DF, Goyal M, Perrone J. A 52-Year-Old Man with Malaise and a Petechial Rash. *J Emerg Med*. 2008 Aug 22.
- Baraff LJ, Lee SI. Fever without source: management of children 3 to 36 months of age. *Pediatr Infect Dis J*. 1992 Feb; 11(2):146-151.
- Barroso D. *Neisseria meningitidis* nasopharynx colonization of diseased patients on presentation and on discharge. *Trop Doct*. 1999 Apr; 29(2):108-109.
- Barroso DE. Aspectos epidemiológicos e biológicos da infecção invasiva por *Neisseria meningitidis* na cidade do Rio de Janeiro: 1989 a 1995 [Doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 1998.
- Barroso DE, Carvalho DM, Netto MA, Santos OH, Nascimento FA, Werneck GL. The effect of subcapsular meningococcal B + C vaccine on the prognosis of patients with meningococcal disease. *Scand J Infect Dis*. 2002; 34(6):417-420.
- Barroso DE, Rebelo MC. Recognition of the epidemiological significance of *Neisseria meningitidis* capsular serogroup W135 in the Rio de Janeiro region, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Sep; 102(6):773-775.
- Bax WA, Cluysenaer OJ, Bartelink AK, Aerts PC, Ezekowitz RA, van Dijk H. Association of familial deficiency of mannose-binding lectin and meningococcal disease. *Lancet*. 1999 Sep 25; 354(9184):1094-1095.
- Beeson PB, Waterman E. Cerebrospinal fever. Analysis of 3,575 cases reports, with special reference to sulphonamide therapy. *British Medical Journal*. 1943; i:497-500.
- Begier EM, Oberste MS, Landry ML, Brennan T, Mlynarski D, Mshar PA, *et al*. An outbreak of concurrent echovirus 30 and coxsackievirus A1 infections associated with sea swimming among a group of travelers to Mexico. *Clin Infect Dis*. 2008 Sep 1; 47(5):616-623.
- Belman AL. Tick-borne diseases. *Semin Pediatr Neurol*. 1999 Dec; 6(4):249-266.
- Bennett DE, Mulhall RM, Cafferkey MT. PCR-based assay for detection of *Neisseria meningitidis* capsular serogroups 29E, X, and Z. *J Clin Microbiol*. 2004 Apr; 42(4):1764-1765.

- Berkowitz FE, Vallabh P, Altman DI, Diamantes F, Van Wyk HJ, Stroucken JM. Jarisch-Herxheimer reaction in meningococcal meningitis. *Am J Dis Child*. 1983 Jun; 137(6):599.
- Bernhard WG, Jordan AC. Purpuric lesions in meningococcal infections: diagnosis from smears and cultures of the purpuric lesions. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1944; 29:273-281.
- Bilukha OO, Rosenstein N. Prevention and control of meningococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005; 54(RR-7):1-21.
- Black S, Shinefield H, Baxter R, Austrian R, Bracken L, Hansen J, *et al*. Postlicensure surveillance for pneumococcal invasive disease after use of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in Northern California Kaiser Permanente. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Jun; 23(6):485-489.
- Bohr V, Hansen B, Jessen O, Johnsen N, Kjersem H, Kristensen HS, *et al*. Eight hundred and seventy-five cases of bacterial meningitis. Part I of a three-part series: clinical data, prognosis, and the role of specialised hospital departments. *J Infect*. 1983 Jul; 7(1):21-30.
- Bonadio WA, Smith DS, Goddard S, Burroughs J, Khaja G. Distinguishing cerebrospinal fluid abnormalities in children with bacterial meningitis and traumatic lumbar puncture. *J Infect Dis*. 1990 Jul; 162(1):251-254.
- Borrow R, Guiver M, Sadler F, Kaczmarek EB, Fox AJ. False positive diagnosis of meningococcal infection by the IS1106 PCR ELISA. *FEMS Microbiol Lett*. 1998 May 15; 162(2):215-218.
- Boslego. *Neisseria meningitidis*. In: Gorbach SL BJ, Blacklow NR, editor. *Infectious Diseases*. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p. 1452.
- Brandtzaeg P. Pathogenesis and pathophysiology of invasive meningococcal disease. In: Frosch M, Maiden MCJ, editors. *Handbook of Meningococcal Disease*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006. p. 427-480.
- Brandtzaeg P, Kierulf P, Gaustad P, Skulberg A, Bruun JN, Halvorsen S, *et al*. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis*. 1989 Feb; 159(2):195-204.

- Brasil. Investigação epidemiológica de casos e epidemias. In: Guia de vigilância epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde; 2005a. p. 37-64.
- Brasil. Vigilância epidemiológica. In: Guia de vigilância epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde; 2005b. p. 19-34.
- Brown DR, Kutler D, Rai B, Chan T, Cohen M. Bacterial concentration and blood volume required for a positive blood culture. *J Perinatol.* 1995 Mar-Apr; 15(2):157-159.
- Bryant PA, Li HY, Zaia A, Griffith J, Hogg G, Curtis N, *et al.* Prospective study of a real-time PCR that is highly sensitive, specific, and clinically useful for diagnosis of meningococcal disease in children. *J Clin Microbiol.* 2004 Jul; 42(7):2919-2925.
- Caputo GL, Baldwin G, Alpert G, Parsonnet J, Gillis ZA, Siber G, *et al.* Effect of meningococcal endotoxin in a rabbit model of shock. *Circ Shock.* 1992 Feb; 36(2):104-112.
- Carrol ED, Newland P, Riordan FA, Thomson AP, Curtis N, Hart CA. Procalcitonin as a diagnostic marker of meningococcal disease in children presenting with fever and a rash. *Arch Dis Child.* 2002 Apr; 86(4):282-285.
- Cartwright K, Reilly S, White D, Stuart J. Early treatment with parenteral penicillin in meningococcal disease. *Bmj.* 1992 Jul 18; 305(6846):143-147.
- Carvalho DM, Werneck GL. Vigilância epidemiológica: história, conceitos básicos e perspectivas. In: Textos de apoio em vigilância epidemiológica. Rio de Janeiro; 1994. p. 1-18.
- Cazorla C, Socolovschi C, Jensenius M, Parola P. Tick-borne Diseases: Tick-borne Spotted Fever Rickettsioses in Africa. *Infect Dis Clin N Am* 2008; 22: 531-544.
- Caugant DA. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *Apmis.* 1998 May; 106(5):505-525.
- Caugant DA, Froholm LO, Bovre K, Holten E, Frasch CE, Mocca LF, *et al.* Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jul; 83(13):4927-4931.

- Caugant DA, Hoiby EA, Magnus P, Scheel O, Hoel T, Bjune G, *et al.* Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol.* 1994 Feb; 32(2):323-330.
- Caugant DA, Kristiansen BE, Froholm LO, Bovre K, Selander RK. Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect Immun.* 1988 Aug; 56(8):2060-2068.
- CDC. International Notes Brazilian Purpuric Fever -- Mato Grosso, Brazil. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1990 December, 14; 39(49):903-905.
- CDC. Control and prevention of meningococcal disease and Control and prevention of serogroup C meningococcal disease: evaluation and management of suspected outbreaks. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1997; 46(RR-5):1-21.
- CDSC. Cluster of invasive meningococcal infection in schools. *Commun. Dis. Rep.* 1995; 5:291.
- Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE, Jr., Musher DM, Triplett P, Mylotte JM, *et al.* A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine (Baltimore).* 2003 Sep; 82(5):322-332.
- Connell TG, Rele M, Cowley D, Buttery JP, Curtis N. How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital. *Pediatrics.* 2007 May; 119(5):891-896.
- Connolly M, Noah N. Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-6. European Meningitis Surveillance Group. *Epidemiol Infect.* 1999 Feb; 122(1):41-49.
- Cookson ST, Corrales JL, Lotero JO, Regueira M, Binsztein N, Reeves MW, *et al.* Disco fever: epidemic meningococcal disease in northeastern Argentina associated with disco patronage. *J Infect Dis.* 1998 Jul; 178(1):266-269.
- Corbett A, Exley R, Bourdoulous S, Tang CM. Interactions between *Neisseria meningitidis* and human cells that promote colonisation and disease. *Expert Rev Mol Med.* 2004 Jul 9; 6(14):1-14.
- Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001 Apr; 39(4):1553-1558.

- Cunniffe JG, Whitby-Strevens S, Wilcox MH. Effect of pH changes in cerebrospinal fluid specimens on bacterial survival and antigen test results. *J Clin Pathol.* 1996 Mar; 49(3):249-253.
- Dagan R, Jenista JA, Menegus MA. Association of clinical presentation, laboratory findings, and virus serotypes with the presence of meningitis in hospitalized infants with enterovirus infection. *J Pediatr.* 1988 Dec; 113(6):975-978.
- Dalton HP, Allison MJ. Modification of laboratory results by partial treatment of bacterial meningitis. *Am J Clin Pathol.* 1968 Mar; 49(3):410-413.
- Dalton MJ, Clarke MJ, Holman RC, Krebs JW, Fishbein DB, Olson JG, *et al.* National surveillance for Rocky Mountain spotted fever, 1981-1992: epidemiologic summary and evaluation of risk factors for fatal outcome. *Am J Trop Med Hyg.* 1995 May; 52(5):405-413.
- Darmstadt GL. Acute infectious purpura fulminans: pathogenesis and medical management. *Pediatr Dermatol.* 1998 May-Jun; 15(3):169-183.
- Dato V, Wagner MM, Fapohunda A. How outbreaks of infectious disease are detected: a review of surveillance systems and outbreaks. *Public Health Rep.* 2004 Sep-Oct; 119(5):464-471.
- de Kleijn ED, Hazelzet JA, Kornelisse RF, de Groot R. Pathophysiology of meningococcal sepsis in children. *Eur J Pediatr.* 1998 Nov; 157(11):869-880.
- de Lemos AP, Yara TY, Gorla MC, de Paiva MV, de Souza AL, Goncalves MI, *et al.* Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup C strains circulating from 1976 to 2005 in greater Sao Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2007 Apr; 45(4):1266-1273.
- de Vries FP, van Der Ende A, van Putten JP, Dankert J. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun.* 1996 Aug; 64(8):2998-3006.
- Doença meningocócica no estado da Guanabara. *Boletim Epidemiológico.* 1974; 6:171-176.
- Dolan-Livengood JM, Miller YK, Martin LE, Urwin R, Stephens DS. Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis.* 2003 May 15; 187(10):1616-1628.

- Duerden BI. Meningococcal infection. *J Med Microbiol.* 1988; 26:161-187.
- Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS, Jr., *et al.* Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med.* 1993 Jan 7; 328(1):21-28.
- Edmond MB, Hollis RJ, Houston AK, Wenzel RP. Molecular epidemiology of an outbreak of meningococcal disease in a university community. *J Clin Microbiol.* 1995 Aug; 33(8):2209-2211.
- Emonts M, Hazelzet JA, de Groot R, Hermans PW. Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *Lancet Infect Dis.* 2003 Sep; 3(9):565-577.
- Fangio P, Desbouchages L, Lacherade JC, De Jonghe B, Terville JP, Leneveu M, *et al.* *Neisseria meningitidis* C:2b:P1.2,5 with decreased susceptibility to penicillin isolated from a patient with meningitis and purpura fulminans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005 Feb; 24(2):140-141.
- Farley MM, Stephens DS, Brachman PS, Jr., Harvey RC, Smith JD, Wenger JD. Invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults. A prospective, population-based surveillance. CDC Meningitis Surveillance Group. *Ann Intern Med.* 1992 May 15; 116(10):806-812.
- Feigin RD, Shackelford PG. Value of repeat lumbar puncture in the differential diagnosis of meningitis. *N Engl J Med.* 1973 Sep 13; 289(11):571-574.
- Feldman WE. Relation of concentrations of bacteria and bacterial antigen in cerebrospinal fluid to prognosis in patients with bacterial meningitis. *N Engl J Med.* 1977 Feb 24; 296(8):433-435.
- Figueiredo RM, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourao MP, *et al.* Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008 Apr; 14(4):667-669.
- Fijen CA, Derkx BH, Kuijper EJ, Mannens M, Poort SR, Peters M, *et al.* Fulminant meningococcal septic shock in a boy with combined inherited properdin and protein C deficiency. *Clin Exp Immunol.* 1995 Nov; 102(2):290-296.
- Fijen CA, Kuijper EJ, Hannema AJ, Sjöholm AG, van Putten JP. Complement deficiencies in patients over ten years old with meningococcal disease due to uncommon serogroups. *Lancet.* 1989 Sep 9; 2(8663):585-588.

- Fijen CA, Kuijper EJ, Tjia HG, Daha MR, Dankert J. Complement deficiency predisposes for meningitis due to nongroupable meningococci and Neisseria-related bacteria. *Clin Infect Dis*. 1994 May; 18(5):780-784.
- Finn A. Bacterial polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Br Med Bull*. 2004; 70:1-14.
- Fraser A, Gafter-Gvili A, Paul M, Leibovici L. Antibiotics for preventing meningococcal infections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; (4):CD004785.
- Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol*. 1998 Oct; 10(5):363-372.
- Frothingham TE. ECHO virus type 9 associated with three cases simulating meningococcemia. *N Engl J Med*. 1958 Sep 4; 259(10):484-485.
- Galimand M, Gerbaud G, Guibourdenche M, Riou JY, Courvalin P. High-level chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis*. *N Engl J Med*. 1998 Sep 24; 339(13):868-874.
- Geiseler PJ, Nelson KE, Levin S, Reddi KT, Moses VK. Community-acquired purulent meningitis: a review of 1,316 cases during the antibiotic era, 1954-1976. *Rev Infect Dis*. 1980 Sep-Oct; 2(5):725-745.
- Glover J. Observations on the meningococcus carrier-state in relation to density of population in sleeping quarters. *Journal of Hygiene*. 1918; 17:367-379.
- Gold R. Clinical aspects of meningococcal disease. In: Vedros NA, editor. *Evolution of Meningococcal Disease*. Florida: CRC Press; 1987. p. 69-97.
- Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med*. 1969a Jun 1; 129(6):1307-1326.
- Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J Exp Med*. 1969b Jun 1; 129(6):1327-1348.
- Good RA, Thomas L. Studies on the generalized Shwartzman reaction. II. The production of bilateral cortical necrosis of the kidneys by a single injection of

bacterial toxin in rabbits previously treated with thorotrast or trypan blue. *J Exp Med.* 1952 Dec; 96(6):625-641.

Granoff DM, Feavers IM, Borrow R. Meningococcal vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. Philadelphia: Saunders; 2004. p. 959-988.

Gray LD, Fedorko DP. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 1992 Apr; 5(2):130-145.

Greenwood BM. Meningococcal disease. In: Strickland GT, editor. *Hunter's Tropical Medicine*. Philadelphia: W B Saunders; 1991. p. 465-471.

Greenwood BM. Acute bacterial meningitis. In: GT S, editor. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease*. Philadelphia: WB Saunders; 2000. p. 372-379.

Greenwood BM, Bradley AK, Wall RA. Meningococcal disease and season in sub-Saharan Africa. *Lancet.* 1985 Oct 12; 2(8459):829-830.

Grist NR, Bell EJ, Assaad F. Enteroviruses in human disease. *Prog Med Virol.* 1978; 24:114-157.

Guibourdenche M, Riou JY. [Meningococci throughout the world : Phenotypic and molecular markers.]. *Med Mal Infect.* 1996 Apr; 26 Suppl 3:389-392.

Halstead SB. Dengue. *Lancet.* 2007 Nov 10; 370(9599):1644-1652.

Harrison LH. Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan; 19(1):142-164.

Harrison LH, Pass MA, Mendelsohn AB, Egri M, Rosenstein NE, Bustamante A, *et al.* Invasive meningococcal disease in adolescents and young adults. *Jama.* 2001 Aug 8; 286(6):694-699.

Harrison LH, Simonsen V, Waldman EA. Emergence and disappearance of a virulent clone of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius, cause of Brazilian purpuric fever. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Oct; 21(4):594-605.

Hart CA, Rogers TR. Meningococcal disease. *J Med Microbiol.* 1993 Jul; 39(1):3-25.

- Hibberd ML, Sumiya M, Summerfield JA, Booy R, Levin M. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. Meningococcal Research Group. Lancet. 1999 Mar 27; 353(9158):1049-1053.
- Imrey PB, Jackson LA, Ludwinski PH, England AC, 3rd, Fella GA, Fox BC, *et al.* Outbreak of serogroup C meningococcal disease associated with campus bar patronage. Am J Epidemiol. 1996 Mar 15; 143(6):624-630.
- Ines Agudelo C, Sanabria OM, Ovalle MV. Serogroup Y meningococcal disease, Colombia. Emerg Infect Dis. 2008 Jun; 14(6):990-991.
- Isaacman DJ, Karasic RB, Reynolds EA, Kost SI. Effect of number of blood cultures and volume of blood on detection of bacteremia in children. J Pediatr. 1996 Feb; 128(2):190-195.
- Jackson LA, Schuchat A, Gorsky RD, Wenger JD. Should college students be vaccinated against meningococcal disease? A cost-benefit analysis. Am J Public Health. 1995 Jun; 85(6):843-845.
- Jacobs RF, Hsi S, Wilson CB, Benjamin D, Smith AL, Morrow R. Apparent meningococcemia: clinical features of disease due to *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. Pediatrics. 1983 Oct; 72(4):469-472.
- Jodar L, Feavers IM, Salisbury D, Granoff DM. Development of vaccines against meningococcal disease. Lancet. 2002 Apr 27; 359(9316):1499-1508.
- Johansen K, Hansen ST, Jr. Symmetrical peripheral gangrene (purpura fulminans) complicating pneumococcal sepsis. Am J Surg. 1993 May; 165(5):642-645.
- Jones DM, Mallard RH. Age incidence of meningococcal infection England and Wales, 1984-1991. J Infect. 1993 Jul; 27(1):83-88.
- Jones GR, Christodoulides M, Brooks JL, Miller AR, Cartwright KA, Heckels JE. Dynamics of carriage of *Neisseria meningitidis* in a group of military recruits: subtype stability and specificity of the immune response following colonization. J Infect Dis. 1998 Aug; 178(2):451-459.
- Jonsson M, Alvin A. A 12-year review of acute bacterial meningitis in Stockholm. Scand J Infect Dis. 1971; 3(2):141-150.

- Junqueira M. Meningite cérebro-espinhal a meningococo. Contribuição para sua epidemiologia em S. Paulo. Seu tratamento. Anais Paulista de Medicina e Cirurgia. 1914; 2(2):42-63.
- Kanegaye JT, Soliemanzadeh P, Bradley JS. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. Pediatrics. 2001 Nov; 108(5):1169-1174.
- Kaplan SL, Schutze GE, Leake JA, Barson WJ, Halasa NB, Byington CL, *et al.* Multicenter surveillance of invasive meningococcal infections in children. Pediatrics. 2006 Oct; 118(4):e979-984.
- Kingston ME, Mackey D. Skin clues in the diagnosis of life-threatening infections. Rev Infect Dis. 1986 Jan-Feb; 8(1):1-11.
- Kirsch EA, Barton RP, Kitchen L, Giroir BP. Pathophysiology, treatment and outcome of meningococemia: a review and recent experience. Pediatr Infect Dis J. 1996 Nov; 15(11):967-978; quiz 979.
- Klein NJ, Ison CA, Peakman M, Levin M, Hammerschmidt S, Frosch M, *et al.* The influence of capsulation and lipooligosaccharide structure on neutrophil adhesion molecule expression and endothelial injury by *Neisseria meningitidis*. J Infect Dis. 1996 Jan; 173(1):172-179.
- Knight JA, Kjeldsberg CR. Cerebrospinal, Synovial, and Serous Body Fluids. In: McPherson RA, Pincus MR, editors. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia: SAUNDERS ELSEVIER; 2007. p. 426-437.
- Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. *Neisseria* species and *Moraxella catarrhalis*. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 491-537.
- Kristiansen BE, Thorsby E. HLA histocompatibility antigens and meningococcal disease. NIPH Ann. 1980 Dec; 3(2):75-79.
- Kuipers S, Aerts PC, van Dijk H. Differential microorganism-induced mannose-binding lectin activation. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003 May 15; 36(1-2):33-39.

- Lamas C, Favacho A, Rozental T, Boia MN, Kirsten AH, Guterres A, *et al.* Characterization of rickettsia rickettsii in a case of fatal Brazilian spotted fever in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2008 Apr; 12(2):149-151.
- Lautenschlager S, Herzog C, Zimmerli W. Course and outcome of bacteremia due to *Staphylococcus aureus*: evaluation of different clinical case definitions. *Clin Infect Dis.* 1993 Apr; 16(4):567-573.
- Leake JA, Kone ML, Yada AA, Barry LF, Traore G, Ware A, *et al.* Early detection and response to meningococcal disease epidemics in sub-Saharan Africa: appraisal of the WHO strategy. *Bull World Health Organ.* 2002; 80(5):342-349.
- Lemos AP, Brandao AP, Gorla MC, Paiva MV, Simonsen V, Melles CE. Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 2001. In: *J Med Microbiol*; 2006. p. 751-757.
- Levin S, Painter MB. The treatment of acute meningococcal infection in adults. A reappraisal. *Ann Intern Med.* 1966 May; 64(5):1049-1056.
- Little JR, Murray PR, Traynor PS, Spitznagel E. A randomized trial of povidone-iodine compared with iodine tincture for venipuncture site disinfection: effects on rates of blood culture contamination. *Am J Med.* 1999 Aug; 107(2):119-125.
- Lorber B. Listeriosis. In: GOLDMAN L, AUSIELLO D, editors. *Goldman: Cecil Medicine.* Philadelphia: SAUNDERS ELSEVIER; 2007. p. 1126-1127.
- MacLennan J, Kafatos G, Neal K, Andrews N, Cameron JC, Roberts R, *et al.* Social behavior and meningococcal carriage in British teenagers. *Emerg Infect Dis.* 2006 Jun; 12(6):950-957.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 17; 95(6):3140-3145.
- Mandl KD, Stack AM, Fleisher GR. Incidence of bacteremia in infants and children with fever and petechiae. *J Pediatr.* 1997 Sep; 131(3):398-404.
- Mardani M, Keshtkar-Jahromi M. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Arch Iran Med.* 2007 Apr; 10(2):204-214.

- McGraw TP, Bruckner DA. Evaluation of the Directigen and Phadebact agglutination tests. *Am J Clin Pathol*. 1984 Jul; 82(1):97-99.
- McGuinness BT, Clarke IN, Lambden PR, Barlow AK, Poolman JT, Jones DM, *et al*. Point mutation in meningococcal por A gene associated with increased endemic disease. *Lancet*. 1991 Mar 2; 337(8740):514-517.
- McLean S, Caffey J. Endemic purpuric meningococcus bacteremia in early life: the diagnostic value of smears from the purpuric lesions. *American Journal of Diseases of the Childhood*. 1931; 42:1053-1074.
- Mendelman PM, Campos J, Chaffin DO, Serfass DA, Smith AL, Saez-Nieto JA. Relative penicillin G resistance in *Neisseria meningitidis* and reduced affinity of penicillin-binding protein 3. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988 May; 32(5):706-709.
- Meningites no Brasil em 1976. *Boletim Epidemiológico*. 1977; 9:157-169.
- Mercier JC, Beaufils F, Hartmann JF, Azema D. Hemodynamic patterns of meningococcal shock in children. *Crit Care Med*. 1988 Jan; 16(1):27-33.
- Meyer TF. Pathogenic neisseriae: complexity of pathogen-host cell interplay. *Clin Infect Dis*. 1999 Mar; 28(3):433-441.
- Meyer TF, Pohlner J, van Putten JP. Biology of the pathogenic *Neisseriae*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994; 192:283-317.
- Michele M, Alberto M, Liana S, Francesco D. Do environmental factors influence the occurrence of acute meningitis in industrialized countries? An epidemic of varying aetiology in Northern Italy. *Eur J Epidemiol*. 2006; 21(6):465-468.
- Miller E, Salisbury D, Ramsay M. Planning, registration, and implementation of an immunisation campaign against meningococcal serogroup C disease in the UK: a success story. *Vaccine*. 2001 Oct 15; 20 Suppl 1:S58-67.
- Mimoz O, Karim A, Mercat A, Cosseron M, Falissard B, Parker F, *et al*. Chlorhexidine compared with povidone-iodine as skin preparation before blood culture. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 1999 Dec 7; 131(11):834-837.
- Miranzi SS, Moraes SA, Freitas IC. Trends in *Haemophilus influenzae* type b meningitis in Brazil in children under five years of age from 1983 through 2002. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39(5):473-477.

- Mongkolrattanothai K, Boyle S, Kahana MD, Daum RS. Severe *Staphylococcus aureus* infections caused by clonally related community-acquired methicillin-susceptible and methicillin-resistant isolates. *Clin Infect Dis*. 2003 Oct 15; 37(8):1050-1058.
- Morello J, Janda W, Doern G. *Neisseria* and *Branhamella*. In: Balows A HW, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology; 1991. p. 258-276.
- Morentin B, Fernandez-Rodriguez A. [Sudden death by bacterial meningitis and septic shock: contribution of the post-mortem diagnosis]. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2006 Aug-Sep; 24(7):471-472.
- Muller PD, Donald PR, Burger PJ, van der Horst W. Detection of bacterial antigens in cerebrospinal fluid by a latex agglutination test in 'septic unknown' meningitis and serogroup B meningococcal meningitis. *S Afr Med J*. 1989 Sep 2; 76(5):214-215.
- Murph RC, Matulis WS, Hernandez JE. Rapidly fatal pneumococcal sepsis in a healthy adult. *Clin Infect Dis*. 1996 Feb; 22(2):375-376.
- Murray PR, Hampton CM. Recovery of pathogenic bacteria from cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. 1980 Oct; 12(4):554-557.
- Nadel S. Lumbar puncture should not be performed in meningococcal disease. *Arch Dis Child*. 2001 Apr; 84(4):375.
- Newcombe J, Cartwright K, Palmer WH, McFadden J. PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. *J Clin Microbiol*. 1996 Jul; 34(7):1637-1640.
- Ni H, Knight AI, Cartwright K, Palmer WH, McFadden J. Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. *Lancet*. 1992 Dec 12; 340(8833):1432-1434.
- Nielsen HE, Andersen EA, Andersen J, Bottiger B, Christiansen KM, Daugbjerg P, et al. Diagnostic assessment of haemorrhagic rash and fever. *Arch Dis Child*. 2001 Aug; 85(2):160-165.
- Nigrovic LE, Kuppermann N, McAdam AJ, Malley R. Cerebrospinal latex agglutination fails to contribute to the microbiologic diagnosis of pretreated children with meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Aug; 23(8):786-788.

- Niklasson PM, Lundbergh P, Strandell T. Prognostic Factors in meningococcal disease. *Scand J Infect Dis.* 1971; 3(1):17-25.
- Norberg A, Christopher NC, Ramundo ML, Bower JR, Berman SA. Contamination rates of blood cultures obtained by dedicated phlebotomy vs intravenous catheter. *Jama.* 2003 Feb 12; 289(6):726-729.
- Noronha CP, Struchiner CJ, Halloran ME. Assessment of the direct effectiveness of BC meningococcal vaccine in Rio de Janeiro, Brazil: a case-control study. *Int J Epidemiol.* 1995 Oct; 24(5):1050-1057.
- Olcen P, Danielsson D, Kjellander J. Laboratory identification of pathogenic *Neisseria* with special regard to atypical strains: an evaluation of sugar degradation, immunofluorescence and co-agglutination tests. *Acta Pathol Microbiol Scand [B].* 1978 Dec; 86B(6):327-334.
- Oragui EE, Nadel S, Kyd P, Levin M. Increased excretion of urinary glycosaminoglycans in meningococcal septicemia and their relationship to proteinuria. *Crit Care Med.* 2000 Aug; 28(8):3002-3008.
- Ostergaard C, Konradsen H, Samuelsson S. Clinical presentation and prognostic factors of *Streptococcus pneumoniae* meningitis according to the focus of infection. *BMC Infect Dis.* 2005;5:93.
- Palmer SR, Corson J, Hall R, Payne S, Ludlow J, Deere B, *et al.* Meningococcal disease in Wales: clinical features, outcome and public health management. *J Infect.* 1992 Nov; 25(3):321-328.
- Parsons HK, Vitovski S, Sayers JR. Immunoglobulin A1 proteases: a structure-function update. *Biochem Soc Trans.* 2004 Dec; 32(Pt 6):1130-1132.
- Peltola H, Kataja JM, Makela PH. Shift in the age-distribution of meningococcal disease as predictor of an epidemic? *Lancet.* 1982 Sep 11; 2(8298):595-597.
- Ploysangam T, Sheth AP. Chronic meningococcemia in childhood: case report and review of the literature. *Pediatr Dermatol.* 1996 Nov-Dec; 13(6):483-487.
- Pollard AJ, Britto J, Nadel S, DeMunter C, Habibi P, Levin M. Emergency management of meningococcal disease. *Arch Dis Child.* 1999 Mar; 80(3):290-296.

- Pollard AJ, DeMunter C, Nadel S, Levin M. Abandoning empirical antibiotics for febrile children. *Lancet*. 1997 Sep 13; 350(9080):811-812.
- Pollard AJ, Nadel S. Course of Disease and Clinical Management. In: Frosch M, Maiden MCJ, editors. *Handbook of Meningococcal Disease. Infection Biology, Vaccination, Clinical Management*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006. p. 481-517.
- Pollard AJ, Ochnio J, Ho M, Callaghan M, Bigham M, Dobsong S. Disease susceptibility to ST11 complex meningococci bearing serogroup C or W135 polysaccharide capsules, North America. *Emerg Infect Dis*. 2004 Oct; 10(10):1812-1815.
- Popovic T, Sacchi CT, Reeves MW, Whitney AM, Mayer LW, Noble CA, *et al*. *Neisseria meningitidis* serogroup W135 isolates associated with the ET-37 complex. *Emerg Infect Dis*. 2000 Jul-Aug; 6(4):428-429.
- Puricelli RC, Kupek E, Bertoincini Rde C. [Control of a community outbreak of group C meningococcal meningitis in Corupa, Santa Catarina State, Brazil, based on rapid and effective epidemiological surveillance and immunization]. *Cad Saude Publica*. 2004 Jul-Aug; 20(4):959-967.
- Racoosin JA, Whitney CG, Conover CS, Diaz PS. Serogroup Y meningococcal disease in Chicago, 1991-1997. *Jama*. 1998 Dec 23-30; 280(24):2094-2098.
- Ragunathan L, Ramsay M, Borrow R, Guiver M, Gray S, Kaczmarek EB. Clinical features, laboratory findings and management of meningococcal meningitis in England and Wales: report of a 1997 survey. *Meningococcal meningitis: 1997 survey report*. *J Infect*. 2000 Jan; 40(1):74-79.
- Rashid R, Pasqualotto AC, Denning DW. A case of spotted fever group rickettsiosis imported into the United Kingdom and treated with ciprofloxacin: a case report. *J Med Case Rep* 2008, 2: 98
- Raymond NJ, Reeves M, Ajello G, Baughman W, Gheesling LL, Carlone GM, *et al*. Molecular epidemiology of sporadic (endemic) serogroup C meningococcal disease. *J Infect Dis*. 1997 Nov; 176(5):1277-1284.
- Renzo A. Moléstia de Weichselbaum: notas e observações relativas a epidemia de 1920 no Rio de Janeiro. *Rev Méd Cirúrg Brasil*. 1921; 29:407-424/493-517.
- Riordan FA, Marzouk O, Thomson AP, Sills JA, Hart CA. The changing presentations of meningococcal disease. *Eur J Pediatr*. 1995 Jun; 154(6):472-474.

- Riordan FA, Thomson AP, Sills JA, Hart CA. Who spots the spots? Diagnosis and treatment of early meningococcal disease in children. *Bmj*. 1996 Nov 16; 313(7067):1255-1256.
- Roch N, Epaulard O, Pelloux I, Pavese P, Brion J-P, Raoult D, Maurin M. African Tick Bite Fever in Elderly Patients: 8 Cases in French Tourists Returning from South Africa. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 47: e28–35.
- Ronne T, Berthelsen L, Buhl LH, Lind I. Comparative studies on pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* during a localized outbreak of serogroup C meningococcal disease. *Scand J Infect Dis*. 1993; 25(3):331-339.
- Rorabaugh ML, Berlin LE, Heldrich F, Roberts K, Rosenberg LA, Doran T, *et al*. Aseptic meningitis in infants younger than 2 years of age: acute illness and neurologic complications. *Pediatrics*. 1993 Aug; 92(2):206-211.
- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Lefkowitz L, Cartter ML, Danila R, *et al*. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. *J Infect Dis*. 1999 Dec; 180(6):1894-1901.
- Ross SC, Densen P. Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine (Baltimore)*. 1984 Sep; 63(5):243-273.
- Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis*. 1995 Apr; 20(4):971-981.
- Sabin AB, Krumbiegel ER, Wigand R. ECHO type 9 virus disease. *AMA J Dis Child*. 1958 Aug; 96(2):197-219.
- Saez-Llorens X, McCracken GH, Jr. Bacterial meningitis in children. *Lancet*. 2003 Jun 21; 361(9375):2139-2148.
- Saez-Nieto JA, Lujan R, Berron S, Campos J, Vinas M, Fuste C, *et al*. Epidemiology and molecular basis of penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in Spain: a 5-year history (1985-1989). *Clin Infect Dis*. 1992 Feb; 14(2):394-402.
- Salzman MB, Rubin LG. Meningococemia. *Infect Dis Clin North Am*. 1996 Dec; 10(4):709-725.

- Saravolatz LD, Manzor O, VanderVelde N, Pawlak J, Belian B. Broad-range bacterial polymerase chain reaction for early detection of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis*. 2003 Jan 1; 36(1):40-45.
- Schelonka RL, Chai MK, Yoder BA, Hensley D, Brockett RM, Ascher DP. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *J Pediatr*. 1996 Aug; 129(2):275-278.
- Schnur ER, Azimi PH, Belchis DA. Poor performance of BACTEC NR 730 blood culture system in early detection of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*. 1989 Apr; 27(4):654-656.
- Scholten RJ, Bijlmer HA. Excess female fatalities among patients with meningococcal disease. *Int J Epidemiol*. 1995 Feb; 24(1):244-245.
- Scholten RJ, Poolman JT, Valkenburg HA, Bijlmer HA, Dankert J, Caugant DA. Phenotypic and genotypic changes in a new clone complex of *Neisseria meningitidis* causing disease in The Netherlands, 1958-1990. *J Infect Dis*. 1994 Mar; 169(3):673-676.
- Shapiro ED, Aaron NH, Wald ER, Chiponis D. Risk factors for development of bacterial meningitis among children with occult bacteremia. *J Pediatr*. 1986 Jul; 109(1):15-19.
- Silva PS, Fonseca MC, Iglesias SB, Carvalho WB, Bussolan RM, Freitas IW. Comparison of two different severity scores (Paediatric Risk of Mortality [PRISM] and the Glasgow Meningococcal Sepsis Prognostic Score [GMSPS]) in meningococcal disease: preliminary analysis. *Ann Trop Paediatr*. 2001 Jun; 21(2):135-140.
- Sinclair JF, Skeoch CH, Hallworth D. Prognosis of meningococcal septicaemia. *Lancet*. 1987 Jul 4; 2(8549):38.
- Singer JI, Maur PR, Riley JP, Smith PB. Management of central nervous system infections during an epidemic of enteroviral aseptic meningitis. *J Pediatr*. 1980 Mar; 96(3 Pt 2):559-563.
- Sjoholm AG, Kuijper EJ, Tijssen CC, Jansz A, Bol P, Spanjaard L, *et al*. Dysfunctional properdin in a Dutch family with meningococcal disease. *N Engl J Med*. 1988 Jul 7; 319(1):33-37.
- Slack J. Deaths from meningococcal infection in England and Wales in 1978. *J R Coll Physicians Lond*. 1982 Jan; 16(1):40-44.

- Spitalnic SJ, Woolard RH, Mermel LA. The significance of changing needles when inoculating blood cultures: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 1995 Nov; 21(5):1103-1106.
- Sprott MS, Kearns AM, Field JM. Penicillin-insensitive *Neisseria meningitidis*. *Lancet*. 1988 May 21; 1(8595):1167.
- Steele RW, Marmer DJ, O'Brien MD, Tyson ST, Steele CR. Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. 1986 May; 23(5):965-966.
- Stephens DS. Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiol Rev*. 2007 Jan; 31(1):3-14.
- Stephens DS, Farley MM. Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis*. 1991 Jan-Feb; 13(1):22-33.
- Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet*. 2007 Jun 30; 369(9580):2196-2210.
- Stephens DS, Hajjeh RA, Baughman WS, Harvey RC, Wenger JD, Farley MM. Sporadic meningococcal disease in adults: results of a 5-year population-based study. *Ann Intern Med*. 1995 Dec 15; 123(12):937-940.
- Stephens DS, Hoffman LH, McGee ZA. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis*. 1983 Sep; 148(3):369-376.
- Strand CL, Wajsborn RR, Sturmman K. Effect of iodophor vs iodine tincture skin preparation on blood culture contamination rate. *Jama*. 1993 Feb 24; 269(8):1004-1006.
- Stuart JM, Cartwright KA, Dawson JA, Rickard J, Noah ND. Risk factors for meningococcal disease: a case control study in south west England. *Community Med*. 1988 May; 10(2):139-146.
- Sullivan TD, LaScolea LJ, Jr. *Neisseria meningitidis* bacteremia in children: quantitation of bacteremia and spontaneous clinical recovery without antibiotic therapy. *Pediatrics*. 1987 Jul; 80(1):63-67.

- Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, *et al.* Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jan 7; 94(1):271-276.
- Taha MK. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol.* 2000 Feb; 38(2):855-857.
- Taha MK, Alonso JM. Molecular epidemiology of infectious diseases: the example of meningococcal disease. *Res Microbiol.* 2008 Jan-Feb; 159(1):62-66.
- Taha MK, Alonso JM, Cafferkey M, Caugant DA, Clarke SC, Diggle MA, *et al.* Interlaboratory comparison of PCR-based identification and genogrouping of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan; 43(1):144-149.
- Taha MK, Olcen P. Molecular genetic methods in diagnosis and direct characterization of acute bacterial central nervous system infections. *Apmis.* 2004 Nov-Dec; 112(11-12):753-770.
- Taha MK, Zarantonelli ML, Neri A, Enriquez R, Vazquez JA, Stefanelli P. Interlaboratory comparison of PCR-based methods for detection of penicillin G susceptibility in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Mar; 50(3):887-892.
- Tarafdar K, Rao S, Recco RA, Zaman MM. Lack of sensitivity of the latex agglutination test to detect bacterial antigen in the cerebrospinal fluid of patients with culture-negative meningitis. *Clin Infect Dis.* 2001 Aug 1; 33(3):406-408.
- Tarlow MJ, Geddes AM. Meningococcal meningitis or septicaemia: a plea for diagnostic clarity. *Lancet.* 1992 Dec 12; 340(8833):1481.
- Tenney JH, Reller LB, Mirrett S, Wang WL, Weinstein MP. Controlled evaluation of the volume of blood cultured in detection of bacteremia and fungemia. *J Clin Microbiol.* 1982 Apr; 15(4):558-561.
- Thacker SB, Choi K, Brachman PS. The surveillance of infectious diseases. *Jama.* 1983 Mar 4; 249(9):1181-1185.
- Thayer JD, Frank PF, Martin JE, Jr. Thayer-Martin Selective Medium for the Cultivation of *Neisseria Meningitidis* from the Nasopharynx. *Am J Public Health Nations Health.* 1965 Jun; 55:923-927.

- Thomas KE, Hasbun R, Jekel J, Quagliarello VJ. The diagnostic accuracy of Kernig's sign, Brudzinski's sign, and nuchal rigidity in adults with suspected meningitis. *Clin Infect Dis*. 2002 Jul 1; 35(1):46-52.
- Thompson MJ, Ninis N, Perera R, Mayon-White R, Phillips C, Bailey L, *et al*. Clinical recognition of meningococcal disease in children and adolescents. *Lancet*. 2006 Feb 4; 367(9508):397-403.
- Thomson RB, Miller JM. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington; 2003. p. 286-330.
- Toews WH, Bass JW. Skin manifestations of meningococcal infection; an immediate indicator of prognosis. *Am J Dis Child*. 1974 Feb; 127(2):173-176.
- Tomkins VN. The diagnostic value of smears from purpuric lesions of the skin meningococcal disease. *Journal of the American Medical Association*. 1943; 123:31-32.
- Treadwell TA, Holman RC, Clarke MJ, Krebs JW, Paddock CD, Childs JE. Rocky Mountain spotted fever in the United States, 1993-1996. *Am J Trop Med Hyg*. 2000 Jul-Aug; 63(1-2):21-26.
- Tsai TF, Vaughn DW, Solomon T. Flaviviruses (Yellow Fever, Dengue, Dengue Hemorrhagic Fever, Japanese Encephalitis, West Nile Encephalitis, St. Louis Encephalitis, Tick-Borne Encephalitis). In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. *Mandell, Bennett, & Dolin: Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 1219-1229.
- Tsang RS, Tsai CM, Henderson AM, Tyler S, Law DK, Zollinger W, *et al*. Immunochemical studies and genetic background of two *Neisseria meningitidis* isolates expressing unusual capsule polysaccharide antigens with specificities of both serogroup Y and W135. *Can J Microbiol*. 2008 Mar; 54(3):229-234.
- Tunkel A. Approach to the patient with central nervous system infection. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 1079-1082.
- Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, *et al*. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis*. 2004 Nov 1; 39(9):1267-1284.

- Tunkel AR, Scheld WM. Acute meningitis. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 1083-1126.
- Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. Mol Immunol. 2003 Nov; 40(7):423-429.
- Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumala M, Tabaki A, *et al.* Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 2005 May; 11(5):386-390.
- Tzeng YL, Stephens DS. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. Microbes Infect. 2000 May; 2(6):687-700.
- Uzuka R, Kawashima H, Hasegawa D, Ioi H, Amaha M, Kashiwagi Y, *et al.* Rapid diagnosis of bacterial meningitis by using multiplex PCR and real time PCR. Pediatr Int. 2004 Oct; 46(5):551-554.
- van de Beek D, de Gans J, McIntyre P, Prasad K. Corticosteroids for acute bacterial meningitis. Cochrane Database Syst Rev. 2007; (1):CD004405.
- van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JW. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. Clin Microbiol Rev. 2000 Jan; 13(1):144-166.
- van Deuren M, van der Ven-Jongekrijg J, Bartelink AK, van Dalen R, Sauerwein RW, van der Meer JW. Correlation between proinflammatory cytokines and antiinflammatory mediators and the severity of disease in meningococcal infections. J Infect Dis. 1995 Aug; 172(2):433-439.
- Van Nguyen Q, Nguyen EA, Weiner LB. Incidence of invasive bacterial disease in children with fever and petechiae. Pediatrics. 1984 Jul; 74(1):77-80.
- Vazquez JA, Enriquez R, Abad R, Alcalá B, Salcedo C, Arreaza L. Antibiotic resistant meningococci in Europe: any need to act? FEMS Microbiol Rev. 2007 Jan; 31(1):64-70.
- Verheul AF, Snippe H, Poolman JT. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. Microbiol Rev. 1993 Mar; 57(1):34-49.

- Vieira JM. Contribuições ao estudo clínico da meningite de Weichselbaum. [Tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro; 1916.
- Vieuseaux M. Memoire sur le maladie qui a regne a Geneve du printemps de 1805. J Méd Chir Pharm. 1805; 11:163.
- Virji M. Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis. Trends Microbiol. 1996 Dec; 4(12):466-469; discussion 469-470.
- Wall R, Wilson J, MacArdle B, Vellani Z. Meningococcal infection: evidence for school transmission. J Infect. 1991 Sep; 23(2):155-159.
- Weber DJ, Cohen MS, Rutala WA. The Acutely Ill Patient with Fever and Rash. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 394-402.
- Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, de Gans J. Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. Lancet Neurol. 2006; 5(2):123-129.
- Wenner HA, Abel D, Olson LC, Burry VF. A mixed epidemic associated with echovirus types 6 and 11: virologic, clinical and epidemiologic studies. Am J Epidemiol. 1981 Sep; 114(3):369-378.
- WHO. Cerebrospinal meningitis in Africa. WHO Chronicle. 1970; (23):54-64.
- WHO. Control of epidemic meningococcal disease. In: World Health Organization. Geneva; 1998. p. 84.
- Wilson GS, Miles AA. *Neisseria*. In: Wilson GS, Miles AA, editors. Topley & Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Baltimore: The Williams & Wilkins; 1964. p. 665-692.
- Wolthers KC, Benschop KS, Schinkel J, Molenkamp R, Bergevoet RM, Spijkerman IJ, *et al*. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children. Clin Infect Dis. 2008 Aug 1; 47(3):358-363.
- Wong VK, Hitchcock W, Mason WH. Meningococcal infections in children: a review of 100 cases. Pediatr Infect Dis J. 1989 Apr; 8(4):224-227.

Ziai WC, Lewin JJ, 3rd. Advances in the management of central nervous system infections in the ICU. *Crit Care Clin.* 2006 Oct; 22(4):661-694; abstract viii-ix.

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de coleta de dados – Projeto PCR

FICHA DE COLETA DE DADOS – PROJETO PCR

Paciente: _____

Idade: _____ anos _____ meses Sexo: M () F ()

Município: _____ Estado: _____

Diagnóstico clínico: _____

Petéquias: sim () não ()

Prontuário: _____

Data da coleta: ____/____/____ Data de entrada no laboratório: ____/____/____

Registro Laboratório: _____

Espécime Clínico: LCR () Sangue () Soro () Plasma () Líquido pleural ()
Líquido sinovial () Líquido pericárdico ()

Exame do LCR:

Aspecto: claro () turvo () purulento () hemorrágico ()

Celularidade _____ mm³ PMN _____% Glicose _____mg% Ptn _____mg%

Bacterioscopia _____ Teste do Látex _____

Cultura de LCR: _____

Hemocultura: _____

Uso prévio de atb: () sim () não

Tempo decorrido entre o início do ATB e a punção lombar (horas): _____

Anexo 2 Artigo publicado