



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Padronização do diagnóstico por PCR tempo real para meningite meningocócica e teste de amostras clínicas de liquor de crianças com suspeita de meningoencefalite

Belo Horizonte

2018

DAYANE DE SOUSA SILVA

Padronização do diagnóstico por PCR tempo real para meningite meningocócica e teste de amostras clínicas de liquor de crianças com suspeita de meningoencefalite

Belo Horizonte
2018

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por mais uma etapa vencida. Agradeço também minha mãezinha, meu exemplo de vida e minha fortaleza.

Ao Instituto Hermes Pardini pelo incentivo à pesquisa e ao crescimento profissional. Especialmente ao pesquisador Elvis Mateo, que sempre me incentivou e apoiou na busca pelo conhecimento, além de toda confiança.

À professora Erna pela oportunidade, orientação e ensinamentos.

Ao setor Pós Analítico do Instituto Hermes Pardini pela compreensão nesses dois anos, pelas ausências em busca do aperfeiçoamento.

À Vanessa por todo companheirismo, amizade e apoio.

À professora Betânia Drumond por todo auxílio no projeto.

À Paula Marinho pela disponibilidade, paciência, ensino e ajuda na parte prática do projeto.

À equipe do laboratório de vírus do Instituto de Ciências Biológicas, Lívia Sacchetto, Izabela Rezende, Andréia Cursino e Adriana Andrade pelo aprendizado compartilhado.

À Mirele e Patrícia (Instituto Hermes Pardini), pela disponibilidade de sempre em ajudar e também pelo fornecimento de alguns insumos ao projeto.

RESUMO

A meningite bacteriana é responsável por elevada morbidade e mortalidade em crianças, a despeito dos recentes avanços nos métodos diagnósticos, no tratamento antimicrobiano e nas medidas profiláticas. Devido a gravidade da doença e o alto potencial de causar epidemias, a meningite bacteriana é uma doença de notificação compulsória e investigação obrigatória. Os agentes etiológicos bacterianos que mais comumente causam meningite são *Haemophilus influenzae* b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) e *Neisseria meningitidis* (meningococo). O prognóstico da meningite depende da precocidade do diagnóstico, da terapia e das medidas de suporte adequadas. Um diagnóstico rápido e suficientemente sensível é de grande importância para a identificação do agente envolvido, facilitando o tratamento precoce com terapias efetivas, além de ser aplicado como uma ferramenta epidemiológica. Este projeto tem como objetivo desenvolver e implementar um método de diagnóstico sensível, rápido e economicamente viável para detectar a presença do agente bacteriano *Neisseria meningitidis* (meningococo) pela técnica de qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa). A técnica da biologia molecular consiste em uma reação de amplificação *in vitro* do DNA em tempo real de forma rápida e quantitativa. Esta reação combina a metodologia de PCR com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. A metodologia permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados, diminuindo o risco de contaminação da amostra e obtendo maior precisão. Foram analisadas 204 amostras de liquor de crianças internadas com suspeita clínica do Hospital João Paulo II por qPCR. A positividade do estudo foi de 2,9 % do total de amostras testadas sendo que 1,9% não foram detectadas em outros testes e compatível com o diagnóstico realizado pelo Hospital João Paulo II. O teste apresentou especificidade e no teste de sensibilidade foram detectados até 10.000 UFC/mL. A metodologia proposta não emprega a etapa de extração de DNA o que reduz riscos de contaminação e perda de ácido nucléico. O teste é rápido quando comparado com os testes convencionais.

Palavras chave: meningite bacteriana, PCR em tempo real, *Neisseria meningitidis*.

ABSTRACT

Bacterial meningitis is responsible for high morbidity and mortality in children, despite the latest advances in diagnostic methods, the antimicrobial treatment and prophylactic measures. Due its, severity and high potential for causing epidemics, bacterial meningitis is a compulsory notification disease and the investigation is mandatory. The bacterial etiological agents that most commonly cause meningitis are *Haemophilus influenzae b* (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) and *Neisseria meningitidis* (meningococcus). The prognosis of meningitis depends on the precocity of diagnosis, therapy and the support measures. A rapid and sensitive diagnosis is of great importance for the identification of the involved etiological agent. In this study we developed a rapid and economical efficient diagnosis of *Neisseria meningitidis* (meningococcus) by qPCR (quantitative polymerase chain reaction). The technique of molecular biology consists of an in vitro amplification reaction of DNA in real time. This reaction combines a PCR methodology with a mechanism of detection and quantification by fluorescence. The analysis allows that the process of amplification, detection and quantification of DNA could be performed in a single step, speeding the results, reducing the risk of contamination and obtaining higher precision. A total of 204 samples of cerebrospinal fluid from hospitalized children of the Hospital João Paulo II with clinical suspicion of meningoenkephalitis were analyzed by qPCR. The positivity of the test was 2.9% and 1.9% were not detected in other tests. The test was specific and was not able to detect up to 10,000 CFU / mL. The proposed method is without the stage of DNA extraction which represents a risk of contamination and a step where nucleic acid loss could occur. The test is fast compared to conventional tests.

Keywords: bacterial meningitis, real-time PCR, *Neisseria meningitidis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

MenC	Vacina conjugada C meningocócica
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> b
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças (do inglês <i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
MM	Meningite meningocócica
MCC	Meningococemia
MM+MCC	Meningite acompanhada de meningococemia
SNC	Sistema nervoso central
SN	Sistema nervoso
SNP	Sistema nervoso periférico
UFC	Unidade formadora de colônia
CO ₂	Dióxido de carbono
LOS	Oligossacarídeos meningocócicos
CT	Ciclo limite (do inglês <i>Threshold Cycle</i>)
LOD	Limite de detecção
Por A	Porina A
Por B	Porina B
CTA	<i>Ágar cystine tripticase</i>
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
SVE	Sistema de vigilância das meningites

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de visualização de camadas meníngeas	8
Figura 2: Penetração de agente infeccioso nas barreiras celulares	10
Figura 3: Sintomas de meningite - Sinal de Kernig	11
Figura 4: Sintomas de meningite - Sinal de Brudzinski	11
Figura 5: Coloração de gram de <i>Neisseria meningitidis</i> no LCR.....	13
Figura 6: Organização do gene capsular da <i>Neisseria meningitidis</i>	15
Figura 7: Penetração meningocócica da barreira hematoencefálica e interação com as meninges levando a meningite.....	16
Figura 8: Mapa com distribuição de incidência de meningite na África	19
Figura 9: Cultura de <i>Neisseria meningitidis</i>	29
Figura 10: Etapas da reação do PCR em tempo real.....	31
Figura 11: Análise parcial <i>in silico</i> dos genes CtrA e SodC das sequências senso e anti-senso.....	45
Figura 12: Amplificação de DNA do gene CtrA de <i>N. meningitidis</i>	48
Figura 13: Teste de sensibilidade analítica para ensaios qPCR para <i>Neisseria meningitidis</i> do gene CtrA.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Casos confirmados, óbitos e incidência de meningite e doença meningocócica no Brasil por tipo de meningite de 2010 a 2016	211
Tabela 2: Análise estrutural e comportamental dos iniciadores CtrA e SodC	400
Tabela 3: Tamanho do DNA amplificado na qPCR	411
Tabela 4: Padrões de avaliação para eficiência no qPCR	466
Tabela 5: Plaqueamento das diluições bacterianas	488
Tabela 6: Reações de qPCR nas diluições bacterianas.....	51
Tabela 7: Dados obtidos do protocolo laboratorial.	52
Tabela 8: Amostras testadas e positividade com outros testes.....	54

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	7
1.1 MENINGITE	7
1.2 <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i>	12
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	17
2.0 EPIDEMIOLOGIA.....	18
2.1 EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL.....	19
3.0 TRATAMENTO, CONTROLE E IMUNIZAÇÃO.....	22
4.0 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	24
4.1 ANÁLISE LABORATORIAL DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR).....	24
5.0 PROBLEMA E JUSTIFICATIVA.....	35
6.0 OBJETIVOS	37
7.0 METODOLOGIA.....	38
7.1 AMOSTRAS CLÍNICAS.....	38
7.2 PREPARO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA.....	38
7.3 CULTIVO DE BACTÉRIAS.....	38
7.4 UTILIZAÇÃO DE ESCALA MC FARLAND	39
7.5 PCR EM TEMPO REAL (QPCR).....	39
8.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
8.1 ANÁLISE PARA SELEÇÃO DOS INICIADORES.....	43
8.2 ANÁLISE DE DNA AMPLIFICADO DO GENE CTRA	46
8.3 SENSIBILIDADE	47
8.4 INTERFERÊNCIA ANALÍTICA NA ANÁLISE DO GENE CTRA.....	50
8.5 ACURÁCIA.....	51

8.6 TESTES DE AMOSTRAS CLÍNICAS	52
9.0 CONCLUSÕES	55
10.0 PERSPECTIVAS	56
REFERÊNCIAS	57

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Meningite

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011), o termo meningite descreve a inflamação das membranas (meninges) e o líquido cefalorraquidiano (LCR) que envolve o cérebro e a medula espinhal. A meningite tem diversos agentes etiológicos infecciosos como vírus, fungos, bactérias e não infecciosos por exemplo traumatismos.

A meningite é uma doença que ameaça a vida, afetando 0,1 a 0,4 recém-nascidos por 1.000 nascidos vivos, com maior incidência em prematuros e crianças cronicamente hospitalizadas. Aproximadamente 10% das crianças afetadas morrem, e 20-50% dos sobreviventes desenvolvem convulsões, deficiências cognitivas, anormalidades motoras, deficiências auditivas e visuais definitivas. Apesar da diminuição da mortalidade, a morbidade não diminuiu desde a década de 1970 (revisado por GORDON et al., 2017).

As meninges que cobrem o sistema nervoso central (SNC) dos humanos são divididos principalmente na dura-máter ou *pachymeninx*, a aracnóide e a pia máter ou leptomeninges. A dura-máter e a aracnóide englobam o cérebro e a medula espinhal e a aracnóide forma a barreira externa que contém o LCR dentro do espaço subaracnóideo. A pia-máter está mais próxima ao cérebro e à medula espinhal, mas é separada do tecido do SNC por um espaço contendo vasos sanguíneos e quantidades variáveis de colágeno (WELLER et al, 2018). A figura 1 mostra um esquema das membranas meníngeas.

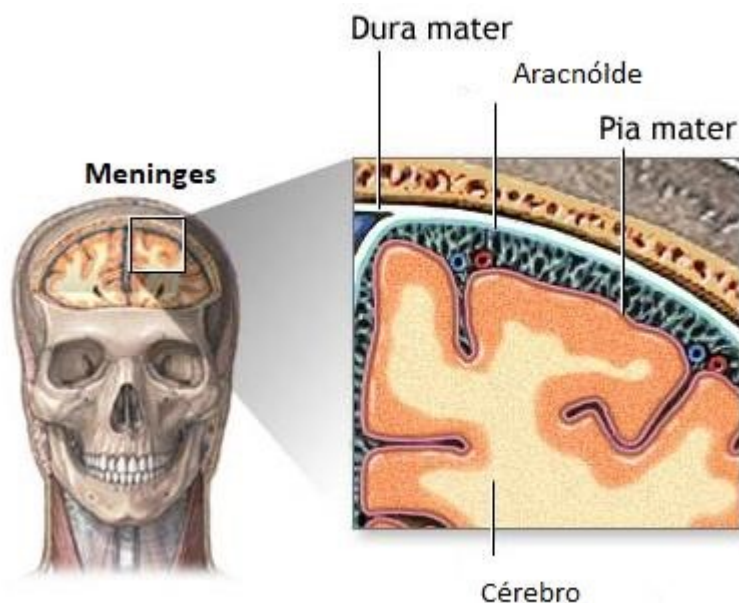


Figura 1: **Esquema de visualização de camadas meníngeas.** As meninges são membranas que cobrem o cérebro e a medula espinhal como demonstrado no aumento da figura: o cérebro e as camadas protetoras dura-máter (2 camadas), aracnóide e pia-máter. Fonte: <http://adamimages.com/Illustration/SearchResult/1/meninges>. Adaptado de A.D.A.M images.

As meninges regulam a sobrevivência e proliferação da glia no prosencéfalo, contribuindo assim para o desenvolvimento cortical que é rico em neurônios. Durante o desenvolvimento do sistema nervoso (SN), os axônios crescentes são orientados para seus alvos por uma combinação de pistas atraentes e repulsivas. Essas pistas podem ser apresentadas como gradientes de diferentes fatores ou como moléculas de superfície celular e extracelular. No embrião em desenvolvimento, as moléculas de orientação do axônio são muitas vezes produzidas por células da glia que estão posicionadas em alvos intermediários ou limites da trajetória axonal e servem como pontos de escolha. Uma das decisões mais fundamentais que os axônios fazem é que podem cruzar ou não a fronteira entre o SNC e o sistema nervoso periférico (SNP). Enquanto a grande maioria dos axônios no SN dos vertebrados não atravessa o limite SN central-periférico, os neurônios motores (células nervosas responsáveis pela produção dos movimentos dos músculos e estão localizadas no corno anterior da medula espinhal ou núcleos dos nervos cranianos) percorrem para a periferia. Por

outro lado, os neurônios sensoriais (transmitem impulsos dos receptores sensoriais, órgãos do sentido, aos outros neurônios do percurso) no gânglio trigeminal e os gânglios da raiz dorsal enviam ramos axônicos para o cérebro e a medula espinhal. Os neurônios motores e sensoriais, que projetam axônios através do SN periférico-central, são atraídos por meninges. Por outro lado, os axônios de ambos os interneurônios (recebem a mensagem dos neurônios sensoriais, processam-na e transferem um comando para as células nervosas seguintes do circuito) dorsais da medula espinhal são repelidos pelas meninges. As respostas dessas populações axonais às meninges são consistentes com suas trajetórias em relação às meninges *in vivo*, sugerindo que fatores de orientação meníngea contribuem para a fiação do SN e controle quais os axônios podem percorrer o limite SN central-periférico (SUTER et al., 2017).

Muitos dos patógenos meníngeos são capazes de colonizar a pele e diferentes superfícies mucosas de indivíduos saudáveis. Em certos casos, as bactérias penetram nas barreiras celulares iniciando uma infecção local que pode resultar em disseminação sistêmica. Uma associação entre bacteremia de alto nível e desenvolvimento de meningite tem sido sugerida para algumas bactérias como por exemplo, *Haemophilus influenzae*. Isso implica que a sobrevivência no sangue é um importante traço de virulência de patógenos meníngeos. Após a sobrevivência na corrente sanguínea ou pela propagação de focos infecciosos nas proximidades do cérebro (mastoidite, sinusite), as bactérias podem invadir o SNC resultando em inflamação das meninges, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, pleocitose do LCR e a infiltração do tecido nervoso como mostrado na figura 2 (revisado por DORAN et al., 2016).

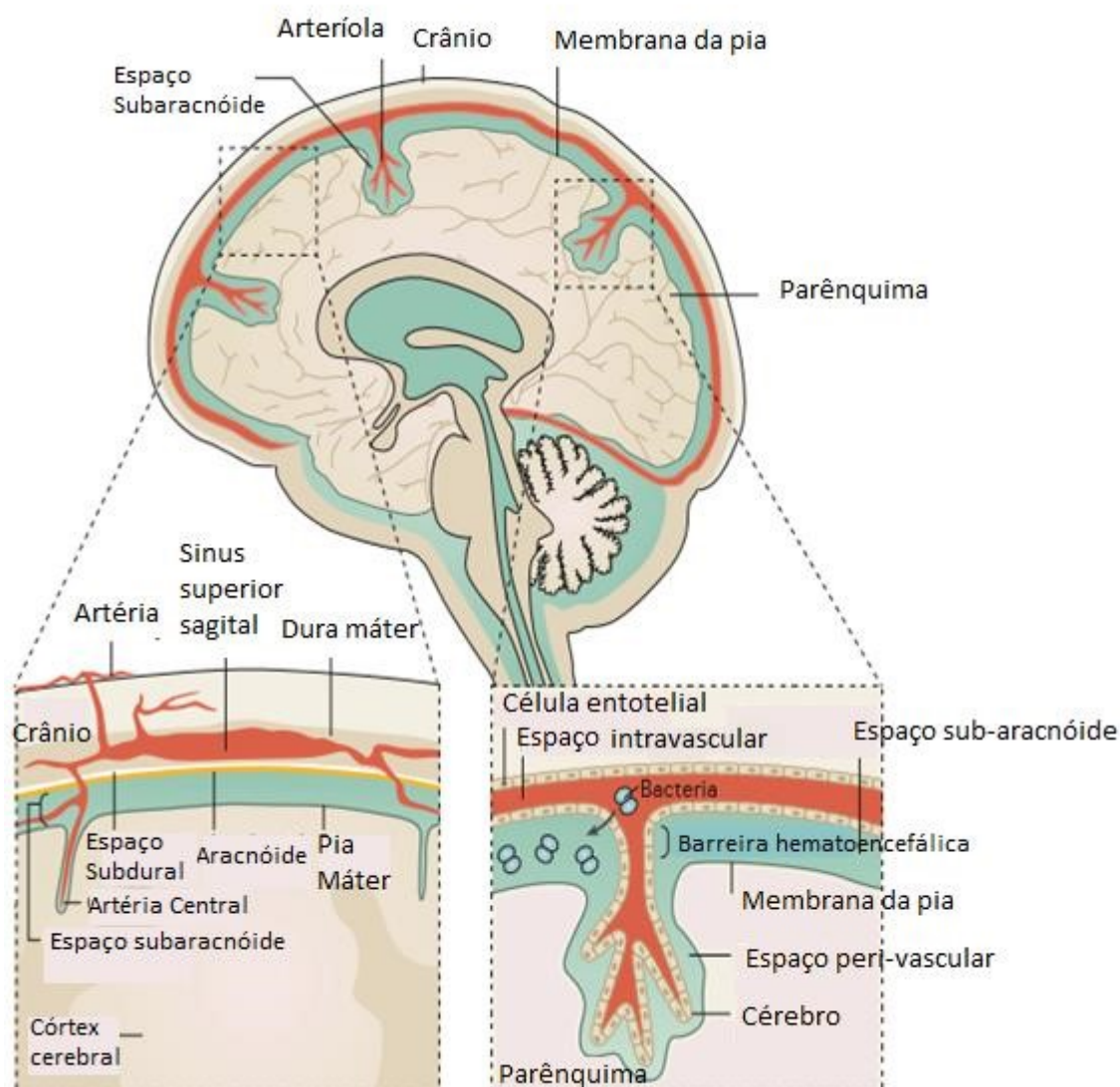


Figura 2: **Penetração de agente infeccioso nas barreiras celulares, sobrevivência na corrente sanguínea e invasão do SNC causando a inflamação das meninges.** Fonte: Beek. D.V et al. Nature Reviews. 2016.

Os sintomas da meningite variam de acordo com a idade, mas consistem em principalmente febre, cefaleia, vômitos, convulsões, nível alterado de consciência, rigidez ou dor no pescoço. As meningites bacterianas são as mais graves e devem ser tratadas imediatamente. Segundo o Ministério da Saúde (2014), a irritação meníngea associa-se aos sinais, como de *Kernig* (Figura 3) em resposta a flexão da articulação do joelho, quando a coxa é colocada em certo grau de flexão,

relativamente ao tronco e de *Brudzinski* (Figura 4) ocorrendo flexão involuntária da perna sobre a coxa e desta sobre a bacia, ao se tentar fletir a cabeça do paciente.



Figura 3: **Sintomas de meningite - Sinal de Kernig.** É a resposta a flexão da articulação do joelho, quando a coxa é colocada em certo grau de flexão, relativamente ao tronco. Fonte: <http://www.adamimages.com/Kernig's-sign-of-meningitis-Illustration/P110095/F4>



Figura 4: **Sintomas de meningite - Sinal de Brudzinski.** Quando ocorre a flexão involuntária da perna sobre a coxa e desta sobre a bacia, ao se tentar fletir a cabeça do paciente. Fonte: <http://www.adamimages.com/Illustration/SearchResult/1/Brudzinski>

Crianças com até nove meses poderão não apresentar os sinais clássicos de irritação meníngea. Neste grupo, outros sinais e sintomas permitem a suspeita diagnóstica, tais como: febre, irritabilidade ou agitação, choro persistente, grito

meníngeo (criança grita ao ser manipulada, principalmente, quando se flete as pernas para trocar a fralda) e recusa alimentar, acompanhado ou não de vômitos, convulsões e abaulamento da fontanela (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A meningite é uma doença de notificação compulsória, sendo os surtos e os aglomerados de casos ou óbitos de notificação imediata. Todos os casos suspeitos ou confirmados devem ser notificados às autoridades competentes, por profissionais da área de assistência, vigilância e pelos laboratórios públicos e privados, por intermédio de contato telefônico, fax, *e-mail* ou outras formas de comunicação. A notificação deve ser registrada no Sistema de informação de agravos de notificação (Sinan), por meio do preenchimento da ficha de investigação de meningite (GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os principais agentes etiológicos de meningite bacteriana são *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* (revisado por GORDON et al., 2017).

1.2 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis é uma bactéria Gram-negativa (figura 5), também denominada de meningococo, pertence ao subgrupo β de proteobactérias. São comensais facultativos, e seu único hospedeiro são seres humanos sem que se tenha conhecimento de outros reservatórios. Os meningococos colonizam a nasofaringe até 35% de indivíduos saudáveis em qualquer momento, e a disseminação direta de meningococos ocorre por transmissão de forma individual (SCHOEN et al., 2014).

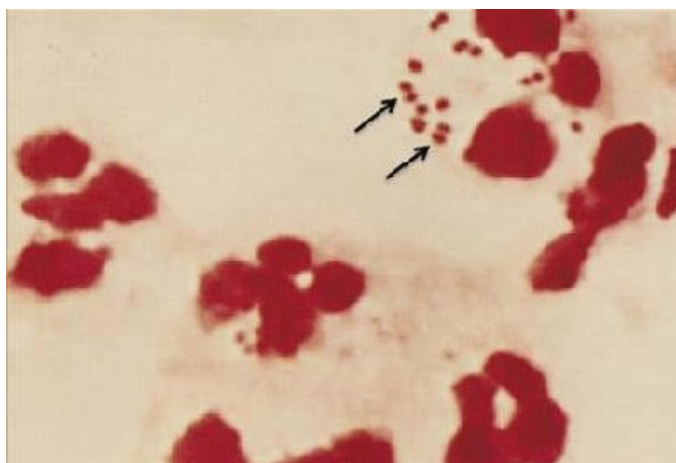


Figura 5: **Coloração de gram de *Neisseria meningitidis* no LCR.** As setas indicam a presença da bactéria no interior dos polimornucleados (PMNs). Fonte: Manual de publicação da Organização Mundial de saúde: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. 2. ed., 2011.

Neisseria meningitidis pode ser encapsulada ou não encapsulada. Contudo, quase todos os organismos invasivos de *Neisseria meningitidis* são encapsulados. A cápsula é composta por um polissacarídeo que é usado para classificar a composição em 12 sorogrupos (A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y e Z). Seis desses sorogrupos causam a grande maioria das infecções em pessoas: A, B, C, W135, X e Y. A distribuição mundial de sorogrupos de *Neisseria meningitidis* é variável. Nas Américas, Europa e Austrália, os sorogrupos B e C são os mais comuns, enquanto o sorogrupo A tem a maioria das incidências na África e na Ásia. Às vezes, os sorogrupos podem reaparecer, aumentando a importância em um país ou região específico, como o sorogrupo C na China ou o sorogrupo Y na América do Norte (WHO MANUAL, 2011).

Os meningococos são também classificados em sorotipos e soro-subtipos, de acordo com a composição antigênica das proteínas de membrana externa PorB e PorA, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

As variações nos genes agrupados no complexo do gene capsular cromossômico são responsáveis pelas diferenças de cápsula polissacarídea nos sorogrupos *N. meningitidis*. Um complexo típico de genes capsulares de *N. meningitidis* consistem em regiões A, B, C, D e E. As regiões A e C estão localizadas entre os genes *galE* e *tex* no cromossomo e são transcritas de forma independente. A

região B é a montante da região A ou a jusante da região C. Os genes na região A são responsáveis pela síntese do polissacarídeo. Os genes na região B, que incluem *lipA* e *lipB*, estão envolvidos na translocação e na expressão superficial dos polímeros de cápsulas. A região C contém quatro genes (*ctrA*, *-B*, *-C* e *-D*) que são necessários para o transporte da cápsula para a membrana externa da bactéria. A região D é composta por uma associação de genes, que incluem *rmlA*, *-B* e *-C* e *galE*, e não é possível que a expressão de impressões seja obrigatória para a biossíntese de lipooligosacarídeos meningocócicos (LOS). A região E contém apenas um gene, *tex*, que foi proposto para regular a síntese da cápsula polissacarídea. O complexo é diferente em sorogrupos individuais e aqueles nas regiões B, C, D e E estão altamente conservados entre os sorogrupos (ZHU et al, 2011). A figura 6 mostra a organização do gene capsular da *Neisseria meningitidis*.

a maioria das pessoas, é um processo imunológico que resulta em anticorpos protetores (MORAES, 2015).

Em áreas de baixo fluxo sanguíneo e, portanto, baixo estresse por cisalhamento, os meningococos têm mostrado adesão à vasculatura no cérebro. Cisalhamento é o fenômeno de deformação ao qual o corpo está sujeito quando as forças que sobre ele agem, provocam um deslocamento em placas diferentes, mantendo volume constante. Além disso, o citoesqueleto leva à formação de microdomínios lipídicos facilitando a resistência às forças de cisalhamento uma vez que as bactérias estão ligadas. Uma vez que a barreira hematoencefálica é rompida, a interação meningocócica com células de revestimento levam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, as leptomeninges, provocando uma reação inflamatória resultando em meningite (Figura 7) (HILL et al, 2010).

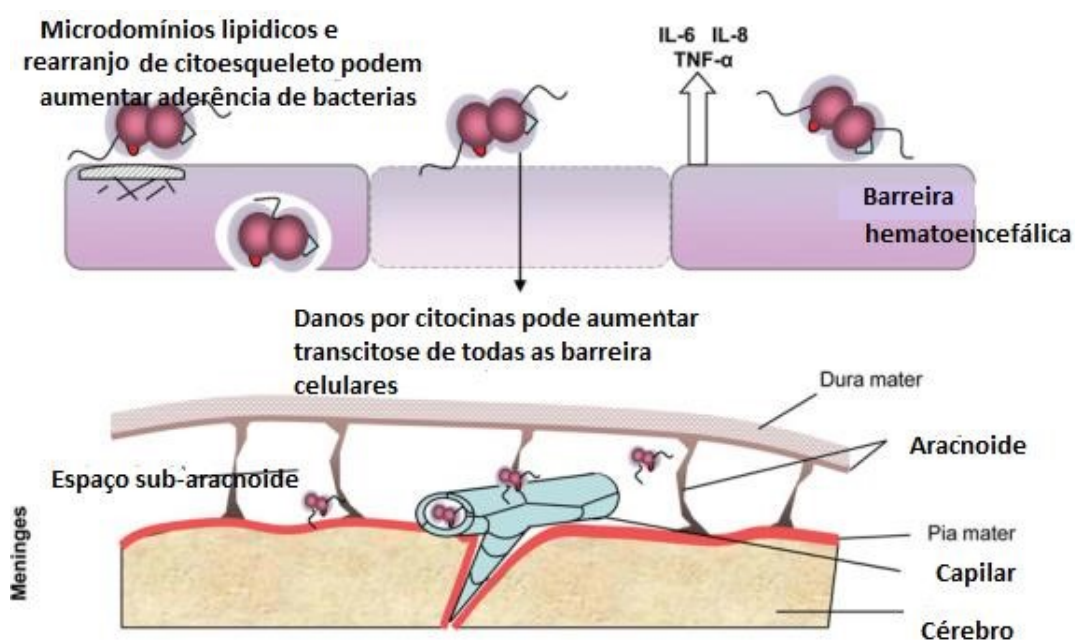


Figura 7: **Penetração meningocócica da barreira hematoencefálica e interação com as meninges levando a meningite.** A formação do microdomínio lipídico e os rearranjos do citoesqueleto podem permitir que as bactérias ligadas resistam ao esforço de cisalhamento. O dano de citocinas pode aumentar a transição bacteriana de todas as barreiras celulares. Fonte: Hill, D.J. et al. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. Clinical Science, 2010.

A colonização da nasofaringe do hospedeiro pela *N. meningitidis* é o primeiro passo para este se tornar um carreador do microrganismo ou para a doença invasiva. A doença geralmente ocorre 1-14 dias após adquirir o patógeno. O contato inicial dos meningococos com as células epiteliais do hospedeiro é mediado pelos pili. Os pili são filamentos de proteína que se projetam da célula, que podem interagir com a molécula CD46 (receptor de complemento inibitório) ou uma integrina do hospedeiro. A adesão é mediada por Opa e Opc, que se ligam respectivamente aos receptores da molécula de adesão dos antígenos carcinoembriônico e integrinas. A subsequente internalização dos meningococos pelas células epiteliais é seguida pela transcitose através dos tecidos basolaterais e disseminação do sangue. A protease imunoglobulina A, secretada pela bactéria invasiva degrada a imunoglobulina A secretora, na superfície da mucosa, contornando essa primeira linha de defesa do hospedeiro (KLIEGMAN et al, 2017).

1.3 Manifestações clínicas

Os sintomas clínicos da infecção por *Neisseria meningitidis* manifesta-se de duas formas clínicas, que são: (I) meningite meningocócica, a mais frequente delas, e a (II) meningococemia, a forma mais grave. A meningite e a meningococemia podem ocorrer isoladamente ou associadas.

A meningite, em geral é grave e caracteriza-se por febre, cefaléia intensa, náusea, vômito, rigidez de nuca, prostração e confusão mental, sinais de irritação meníngea, acompanhados de alterações do líquido cefalorraquidiano. No curso da doença, podem surgir delírio e coma. Dependendo do grau de comprometimento encefálico, o paciente poderá apresentar também convulsões, paralisias, tremores, transtornos pupilares, hipoacusia (diminuição da capacidade auditiva), ptose palpebral (situação em que uma pálpebra encontra-se caída) e nistágmo (oscilações repetidas e involuntárias rítmicas de um ou ambos os olhos em algumas ou todas as posições de mirada). Casos fulminantes, com sinais de choque, também podem ocorrer (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

As convulsões estão presentes em 20% das crianças com meningite meningocócica. Sua ocorrência, assim como a presença de sinais neurológicos focais, é menos frequente que nas meningites por pneumococo ou por *Haemophilus influenzae* sorotipo B. Nos casos de meningococcemia, o coma pode sobrevir em algumas horas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A meningite associa-se, em cerca de 60% dos casos, à presença de lesões cutâneas petequiais bastante características (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Quase 20% dos sobreviventes adquirem sequelas clínicas permanentes significativas, incluindo comprometimento neurológico, perda auditiva e amputação de membros (GANDHI, BALMER and YORK, 2016).

2.0 EPIDEMIOLOGIA

A meningite bacteriana aguda é uma das doenças mais graves que afetam principalmente crianças e adolescentes, e continua a ser um grave problema de saúde pública. Estima-se que em até 1,2 milhões de casos ocorrem 135.000 mortes anualmente em todo o mundo, e 10-20% dos sobreviventes ficam com deficiências. As taxas de incidência e de letalidade variam conforme a região, país, patógeno, e faixa etária. Sem tratamento, a taxa de letalidade pode ser tão elevada quanto 70%, e um em cada cinco sobreviventes de meningite bacteriana podem apresentar sequelas permanentes, incluindo perda auditiva, deficiência neurológica, ou perda de um membro (WHO MANUAL, 2011).

Em todo o mundo, a incidência de meningite causada por *N. meningitidis* é mais elevada na região africana conhecido como o "cinturão da meningite" mostrado na Figura 8. Esta região hiper endêmica estende do Senegal à Etiópia, e é caracterizada por epidemias sazonais durante a estação seca (taxa de incidência: 10-100 casos por 100.000 habitantes), pontuado por epidemias explosivas em 8 ciclos de 12 anos (taxas de incidência pode ser maior do que 1.000 casos por 100.000 habitantes). Através do cinturão da meningite, pelo menos, 350 milhões de pessoas estão em risco de meningite durante estas epidemias anuais. Epidemias de meningite são geralmente causados pelo sorogrupo A, apesar de ocorrência de surtos causados

atualmente são os sorotipos circulantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Na tabela 1 está representado os casos confirmados, óbitos e incidência de meningite e doença meningocócica no Brasil no período de 2010 a 2016.

A doença meningocócica é endêmica no Brasil e surtos esporádicos foram registrados. Meningococo é a principal causa de meningite bacteriana no Brasil. Até 2005, o sorogrupo B foi o mais frequente isolado em casos invasivos (67%) em todas as faixas etárias. Posteriormente, a circulação do sorogrupo C aumentou, tornando-se o mais predominante e contabilístico para mais de 74% dos isolados em 2010. A incidência da doença meningocócica foi muito alta, aproximadamente 1,6 casos por 100.000 habitantes, com maior incidência entre lactentes e crianças pequenas, bem como surtos recorrentes em diferentes regiões. Os números de infecções por meningococos levaram à inclusão de vacina conjugada C meningocócica (MenC) no Programa Nacional de Imunização em 2010. O regime recomendado consistiu em duas doses (aos três e cinco meses de idade) e um reforço (entre 12 e 15 meses de idade). Bebês entre 12-23 meses receberam uma dose da vacina no ano de implementação do programa (revisado por MORAES et al., 2017). Um complexo clonal virulento principal 103 (CC103) tem sido genótipo prevalente associado à epidemia do sorogrupo C em 2000 e vários surtos foram identificados (revisado por ANDRADE et al., 2017).

O Sistema de Vigilância das Meningites (SVE/Meningites) foi implantado em 1975 e compreende todas as atividades e atores envolvidos desde a identificação de um caso suspeito até a adoção das medidas de prevenção e controle da doença na comunidade. Dessa forma, a operação desse sistema pressupõe uma boa integração técnica entre as atividades de assistência aos casos, de identificação e estudo das características do agente etiológico e de análise epidemiológica do comportamento da doença na população. Ao longo dos anos, foi incorporada a esse sistema a vigilância de outras meningites de interesse para a saúde pública, como a meningite tuberculosa, a meningite por *H. influenzae*, a meningite por *S. pneumoniae* e as meningites virais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Tabela 1: Casos confirmados, óbitos e incidência de meningite e doença meningocócica no Brasil por tipo de meningite de 2010 a 2016

Fonte: Ministério da saúde, Sinan

a) Incidência de casos de meningite entre 2010 a 2016 por agente etiológico

	2010				2011				2012			
	Casos	Óbitos	Incid.	Letal.	Casos	Óbitos	Incid.	Letal.	Casos	Óbitos	Incid.	Letal.
Doença Meningocócica	3003	617	1,57	20,5	2840	605	1,48	21,3	2557	554	1,33	21,7
Meningite Tuberculosa	376	72	0,20	19,1	365	75	0,19	20,5	342	45	0,18	13,2
Meningite por <i>Haemophilus</i>	142	20	0,07	14,1	130	28	0,07	21,5	148	20	0,08	13,5
Meningite Pneumocócica	1163	349	0,61	30,0	1219	366	0,63	30,0	1107	296	0,57	26,7
Meningite por Outras bactérias	3151	397	1,65	12,6	3140	417	1,63	13,3	3114	388	1,60	12,4
Meningite Viral	8319	105	4,36	1,3	8595	90	4,47	1,0	9938	89	5,12	0,9
Meningite por Outras etiologias	798	167	0,42	20,9	715	120	0,37	16,8	736	140	0,38	19,0
Meningite não especificada	3489	302	1,83	8,7	3595	310	1,87	8,6	3689	307	1,90	8,3

Fonte: Sinan/SVS/CGDT/UVRI

*Atualizados em abril/2017

	2013				2014*				2015*				2016*			
	Casos	Óbitos	Incid.	Letal.	Casos	Óbitos	Incid.	Letal.	Casos	Óbitos	Incid.	Letal.	Casos	Óbitos	Incid.	Letal.
2106	448	1,09	21,3	1617	336	0,83	20,8	1304	279	0,67	21,4	1105	243	0,57	21,9	
364	70	0,19	19,2	409	72	0,21	17,6	346	58	0,18	16,7	306	65	0,16	21,3	
106	10	0,05	9,4	116	20	0,06	17,2	120	20	0,06	16,6	100	13	0,05	13,0	
1082	293	0,56	27,1	953	279	0,49	29,3	938	270	0,48	28,8	881	259	0,45	29,4	
2772	375	1,42	13,5	2947	397	1,51	13,5	2825	396	1,45	14,0	2338	338	1,20	14,4	
8813	114	4,54	1,3	8521	90	4,39	1,1	7183	124	3,70	1,7	7102	118	3,66	1,7	
787	150	0,41	19,1	775	151	0,40	19,5	801	161	0,41	20,1	672	129	0,35	19,2	
3092	322	1,59	10,4	2316	273	1,19	11,8	2485	264	1,82	10,6	2363	266	1,22	11,3	

b) Incidência de casos de meningite meningocócica entre 2010 a 2016 por sorogrupo

	2010				2011				2012			
	Casos	Óbitos	Incid.	Letal.	Casos	Óbitos	Incid.	Letal.	Casos	Óbitos	Incid.	Letal.
Sorogrupo B	198	37	0,10	18,7	242	41	0,13	17	237	50	0,12	21,1
Sorogrupo C	1210	229	0,64	18,9	1141	219	0,60	19,1	1034	210	0,53	20,3
Sorogrupo W	76	28	0,04	36,8	83	21	0,04	25,3	66	18	0,03	27,3
Sorogrupo Y	14	2	0,01	14,3	30	3	0,02	10,0	38	7	0,02	18,4
Sorogrupos Ignorados	1494	318	0,78	21,3	1333	321	0,70	24,1	1167	266	0,60	22,8

Fonte: Sinan/SVS/CGDT/UVRI

*Atualizados em abril/2017

	2013			2014*			2015*			2016*				
	Óbitos	Incid.	Letal.	Casos	Óbitos	Incid.	Letal.	Casos	Óbitos	Incid.	Letal.	Casos	Óbitos	Incid.
39	0,10	19,7	150	25	0,08	16,7	157	29	0,08	18,5	106	13	0,05	12,3
136	0,38	18,5	549	97	0,28	17,6	357	70	0,18	19,6	303	73	0,16	24,1
18	0,04	23,3	59	19	0,03	32,2	52	12	0,03	23	46	7	0,02	15,2
7	0,01	29,1	23	5	0,01	21,7	13	2	0,01	15,3	17	5	0,01	29,4
246	0,55	23,0	831	189	0,43	22,7	719	164	0,37	22,8	626	144	0,32	23,0

3.0 TRATAMENTO, CONTROLE E IMUNIZAÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a doença meningocócica é potencialmente fatal e deve ser sempre vista como uma emergência médica. A admissão a um hospital ou centro de saúde é necessária. O isolamento do paciente não é necessário. O tratamento com antibiótico apropriado deve ser iniciado o mais rápido possível, idealmente após a punção lombar ter sido realizada. Se o tratamento for iniciado antes da punção lombar, pode ser difícil cultivar a bactéria do fluido espinhal e confirmar o diagnóstico. No entanto, a confirmação do diagnóstico não deve atrasar o tratamento. Uma variedade de antibióticos pode tratar a infecção, incluindo penicilina, ampicilina e ceftriaxona. Sob condições epidêmicas na África em áreas com infra-estrutura e recursos de saúde limitados, a ceftriaxona é a droga de escolha. O uso de antibiótico deve ser associado a outros tipos de tratamento de suporte, como reposição de líquidos e cuidadosa assistência (PORTAL DA SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Mais de 80% do diagnóstico fora do período neonatal é caracterizado por *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*. Atualmente, há vacinas (conjugado de proteína-polissacarídeo) que são eficazes contra esses patógenos quando administrados durante a infância nos programas de imunização, mas seu custo elevado apresenta um desafio em países com baixa e média renda, onde é necessário demonstrar seu benefício para justificar esse investimento (FUKASAWA et al, 2017).

No Brasil a recomendação da antibioticoterapia é diferenciada para adultos e crianças. Para lactentes com até 2 meses de idade, utiliza-se, inicialmente, a associação da ampicilina com uma cefalosporina de terceira geração (cefotaxima). A ceftriaxona deve ser evitada no período neonatal, por competir com a bilirrubina. Outra opção é iniciar o tratamento com associação de ampicilina com um aminoglicosídeo – gentamicina ou amicacina. Esta associação é empregada não só pelo espectro de cada antibiótico em si, mas também devido ao sinergismo que apresenta contra algumas enterobactérias também responsáveis por meningite nesta

faixa etária. Alternativamente pode-se empregar, em vez da ampicilina, a penicilina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Para crianças com idade maior que 2 meses de idade, o tratamento empírico de meningites bacterianas deve ser iniciado com uma cefalosporina de terceira geração – ceftriaxona ou cefotaxima. O esquema empírico clássico utilizando a associação de ampicilina e cloranfenicol só se justifica se houver indisponibilidade das drogas previamente citadas. Nos casos de pacientes com história de anafilaxia aos antibióticos β -lactâmicos, pode-se usar o cloranfenicol no tratamento empírico inicial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Em adultos, a antibioticoterapia, segundo etiologia, deve ser ajustada de acordo com resultados do teste de sensibilidade.

A meningite faz parte da Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória, de acordo com a Portaria nº 5, de 21 de fevereiro de 2006. É de responsabilidade de todo serviço de saúde notificar todo caso suspeito às autoridades municipais de saúde, que deverão providenciar, de forma imediata, a investigação epidemiológica e avaliar a necessidade da adoção das medidas de controle pertinentes. Todos os profissionais de saúde das unidades públicas e privadas de ensino e de laboratórios públicos e privados são responsáveis pela notificação. O funcionamento de unidades de vigilância epidemiológica (UVE) nos hospitais é fundamental para a busca ativa de casos em seu âmbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Até recentemente, as vacinas de meningococo aprovadas, apenas protegiam contra cepas meningocócicas causadas por quatro dos seis principais sorogrupos causadores de doença de *Neisseria meningitidis*. Especificamente, a infecção com os sorogrupos A, C, W e Y pode ser prevenida usando polissacarídeos capsulares purificados ou vacinas conjugadas com proteínas polissacarídicas capsulares. A vacinação de rotina com uma vacina conjugada meningocócica ACWY é recomendada nos Estados Unidos para todas as pessoas com idades compreendidas entre os 11 e os 18 anos e para pessoas consideradas com maior risco de exposição (GANDHIA, BALMERB e YORK, 2016).

4.0 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico inicial de meningite meningocócica pode ser feito por exame clínico seguido por uma punção lombar do líquido. Os principais testes para a confirmação de casos suspeitos utilizados no Brasil são: exame quimiocitológico de LCR; bacterioscopia direta de LCR; cultura (LCR, sangue ou petéquias); contraímunoeletroforese (LCR e soro); aglutinação de látex (LCR e soro); reação em cadeia da polimerase. A aparência do LCR atua como um indicador. O LCR normal deve ser claro e incolor. Nos processos infecciosos, há um aumento de células (polimorfonucleados), causando uma aparência turva, cuja intensidade varia com a quantidade e o tipo, podendo ser purulento (SALGADO et al, 2013). Às vezes, as bactérias podem ser vistas em exames microscópicos. O diagnóstico é confirmado pelo crescimento das bactérias a partir de espécimes de fluido espinhal ou sangue, por testes de aglutinação ou pela reação em cadeia da polimerase. A identificação dos sorogrupos e dos testes de susceptibilidade aos antibióticos é importante para definir medidas de controle (WHO, 2011).

A reação em cadeia da polimerase do LCR tem sido sugerida como um teste diagnóstico rápido para meningite bacteriana, e a amplificação do DNA de bactérias não-viáveis potencialmente poderia facilitar o diagnóstico em casos negativos de cultura (WU et al, 2013).

4.1 Análise laboratorial do líquido cefalorraquidiano (LCR)

Para a coleta do LCR são utilizados três frascos estéreis sem anticoagulantes onde, um será utilizado para análises bioquímicas e sorológicas, outro para exames microbiológicos e o terceiro para contagem celular. Dessa forma, o primeiro tubo é destinado ao setor de análise bioquímica e sorológica, o segundo para o setor de microbiologia e o terceiro para o setor de citologia. Se a coleta for efetuada apenas em um frasco, deve-se realizar primeiro os exames bacteriológicos, seguido do hematológico/citológico e por último o sorológico (LEITE et al, 2016).

A observação visual da coloração e do aspecto do LCR é a etapa inicial da análise e pode fornecer importantes informações diagnósticas. O LCR, em condições

normais, é incolor (como água de rocha), porém, em condições patológicas, pode apresentar alteração na coloração. A coloração deve ser registrada antes e depois do processo de centrifugação. A amostra é considerada xantocrômica quando, após centrifugação, tem tonalidade que varia entre rosa, amarelo ou laranja, o que ocorre pela presença de hemoglobina (hemólise) ou pelas concentrações elevadas de proteínas ou bilirrubina. A possibilidade de existência de outras substâncias, como iodo, caroteno ou melanina, deve ser considerada. Em recém-nascidos, principalmente os prematuros, é comum observar xantocromia, em virtude da imaturidade da função hepática. A intensidade da xantocromia pode ser obtida por métodos espectrofotométricos, porém, na rotina, utiliza-se o método visual, cuja sensibilidade é de 47,3%, o qual é feito pela comparação da cor da amostra com padrões de coloração de bicromato de potássio, em solução de diversas concentrações (COMAR et al, 2009).

Como o LCR geralmente contém apenas algumas células e albumina, as células começam a sofrer danos dentro de poucas horas após a obtenção do espécime clínico. Portanto, as amostras de citologia devem, idealmente, ser processadas dentro de 2 horas. No líquido normal, a quantidade de células totais geralmente é igual ou menor que 5 células/mL, muitas vezes com predominância linfocítica (linfócitos 93% - 97%) acompanhado de poucos leucócitos polimorfonucleares (1% - 3%) e monócitos (0,5% - 1%). Um aumento incremental no número de células é denominada "pleocitose", que pode ser leve, moderada ou intensa. O número e o tipo de células presentes no líquido geralmente fornecem pistas de diagnóstico da causa da meningite (MARTÍNEZ-GIRON, PANTANOWITZ, 2017).

Assim, parâmetros de laboratório foram adicionados para auxiliar no diagnóstico de meningite bacteriana aguda e requerem o LCR mostrando contagens elevadas de glóbulos brancos (entre 100 e 10000 células / mm³), sendo que 80 a 95% das células são neutrófilos, concentração de proteína elevada e diminuição da glicose (GUARNER et al, 2013).

4.1.1 Bacterioscopia direta

A coloração de Gram é um método empírico para diferenciar espécies bacterianas em dois grandes grupos com base nas propriedades químicas e físicas de suas paredes celulares. Também pode ser usado para avaliar a qualidade de uma amostra clínica. O LCR deve ser adequadamente centrifugado para obter um sedimento para o procedimento. A preparação adequada do esfregaço com o sedimento LCR deve ser com uma monocamada de organismos suficientemente densos para facilitar a visualização, mas suficientemente finos para revelar características morfológicas. As lâminas devem estar limpas para utilização. As cepas, de controle de qualidade, positivas e negativas devem ser testadas juntamente com os espécimes desconhecidos (WHO, 2011). Pode ser realizada a partir do LCR e outros fluidos corpóreos normalmente estéreis e de raspagem de petéquias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os esfregaços corados com a coloração de Gram das amostras de LCR podem fornecer uma ferramenta preliminar rápida para o diagnóstico em 60-90% dos pacientes que se correlaciona com a concentração de bactérias nas amostras de LCR. No entanto, a sensibilidade da coloração com Gram varia consideravelmente para diferentes microorganismos (KHATER e ELABD, 2016).

Alguns fatores influenciam a qualidade e sensibilidade dessa metodologia como: contaminação da amostra clínica, características do próprio agente infeccioso, infecções mistas, tratamento com antibiótico do paciente, razões técnicas (fixação, excesso ou descoloração), interpretação equivocada do leitor e quantidade do agente infeccioso na amostra biológica.

4.1.2 Análise Bioquímica

No exame bioquímico do LCR a concentração normal de glicose no líquido corresponde a dois terços da sanguínea (42 a 78 mg% em recém-nascidos e 50 a 80 mg% em adultos); é comum ocorrer hipoglicorraquia em alguns casos de meningites como na fase aguda da meningite bacteriana e também nos processos crônicos e supurativos. Esta baixa concentração de glicose se dá pelo seu consumo pelos microrganismos presentes (LEITE et al, 2016).

A dosagem de proteínas no LCR no estágio inicial da meningite se encontra elevada (>40 mg/100 mL), e a medida que o processo inflamatório se reduz, a concentração de proteína também se reduz, em associação com a pleocitose. Dependendo do local da punção, temos valores diferentes de referências para proteínas (LEITE et al, 2016).

Os níveis de lactato no LCR, diferente dos níveis de glicose, não estão vinculados à concentração sangüínea, e sim à sua produção intratecal (canal raquideano, diretamente no espaço subaracnoide). O consumo da glicose como fonte de energia nas infecções bacterianas do SNC resulta em diminuição dos níveis de glicose e aumento do lactato, sugerindo elevação da glicólise anaeróbica. A determinação dos níveis de lactato é utilizada principalmente no diagnóstico diferencial entre as meningites bacterianas e virais (DIMAS, 2008).

Essas dosagens traduzem a intensidade do processo infeccioso e orienta a suspeita clínica, mas não deve ser utilizado para conclusão do diagnóstico final, pelo baixo grau de especificidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

4.1.3 Análise sorológica

Os testes de detecção de antígenos das bactérias habitualmente envolvidas na etiologia das meningites auxiliam no diagnóstico. Têm a vantagem de serem testes rápidos e de não se alterarem com o uso prévio de antibióticos. A especificidade desses testes é boa, mas a sensibilidade é limitada, ou seja, resultados negativos não excluem meningite bacteriana.

A contraímuneletroforese cruzada é uma técnica simples e rápida empregada para a detecção de antígenos bacterianos em amostras biológicas quando submetidos à passagem de corrente elétrica contínua, que migram para o pólo positivo e formam uma linha de precipitação quando encontram -os anticorpos específicos, evidenciando a presença da bactéria nestas amostras clínicas. O material clínico preferencial para o ensaio é o LCR e o soro. A técnica detecta os antígenos do meningococo A, B, C e W presentes na amostra clínica. Apesar de apresentar uma alta especificidade (em torno de 90%), a sensibilidade é baixa, especialmente em amostras de soro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A aglutinação pelo látex detecta o antígeno bacteriano em amostras de LCR e soro, ou outros fluidos biológicos. Partículas de látex, sensibilizadas com antissoros específicos, permitem por técnica de aglutinação rápida (em lâmina ou placa), detectar o antígeno bacteriano nas amostras. Podem ocorrer resultados falso-positivo em indivíduos portadores do fator reumático ou em reações cruzadas com outros agentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

4.1.4 Cultura bacteriana

O crescimento bacteriano no meio de cultura é considerado o método padrão ouro para diagnóstico da doença meningocócica, por ter alto grau de especificidade. Tem como objetivo o isolamento da bactéria para identificação da espécie, e posteriormente o sorogrupo, sorotipo e soro-subtipo do meningococo invasivo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a *Neisseria meningitidis* pode ser isolada de LCR, sangue, aspirado de petéquias, sufusões (ação que consiste no derramamento ou derrame de um líquido) hemorrágicas ou biópsias, líquido sinovial, *swab* de conjuntiva, aspirado traqueal, ou transtraqueal ou escarro, *swab* de nasofaringe (preferível a *swab* de orofaringe). É uma bactéria pouco mais tolerante a variações de temperatura e recomenda-se para transporte ambientes com CO₂. Cresce bem em ágar sangue, mas por precaução, deve-se inocular também em ágar chocolate. Incubar em jarra com umidade (bola de algodão e água estéril) e CO₂ (jarra com vela ou gerador de CO₂). Materiais com maior microbiota contaminante ou menor expectativa de isolamento, inocular, além do meio rico, em meio seletivo como Thayer Martin modificado ou meio New York City. Meios seletivos como Thayer Martin inibem crescimento de enterobactérias, a maioria das outras espécies de *Neisserias* (7,5 µg/mL de colistina), gram positivos (Vancomicina 3 µg/mL) e fungos (13,5 µg/mL de nistatina); e contém suplementos para suportar crescimento da *Neisserias meningitidis* e da *Neisseria gonorrhoeae*. Todas *neisserias* são oxidase positivas e catalase positivas, exceto *Neisseria elongata* e *Kingella denitrificans*. Todas utilizam carboidratos por via oxidativa e não fermentativa, sendo baixa a acidez, de modo que

podem acontecer reações duvidosas com o meio CTA (*cystine tripticase agar*) com indicador vermelho de fenol, que sempre foi muito utilizado em rotina laboratorial.

No meio sólido as colônias apresentam-se de forma convexa, transparentes, não pigmentadas e, não hemolíticas e variam de 1 a 5 mm de diâmetro (figura 9).

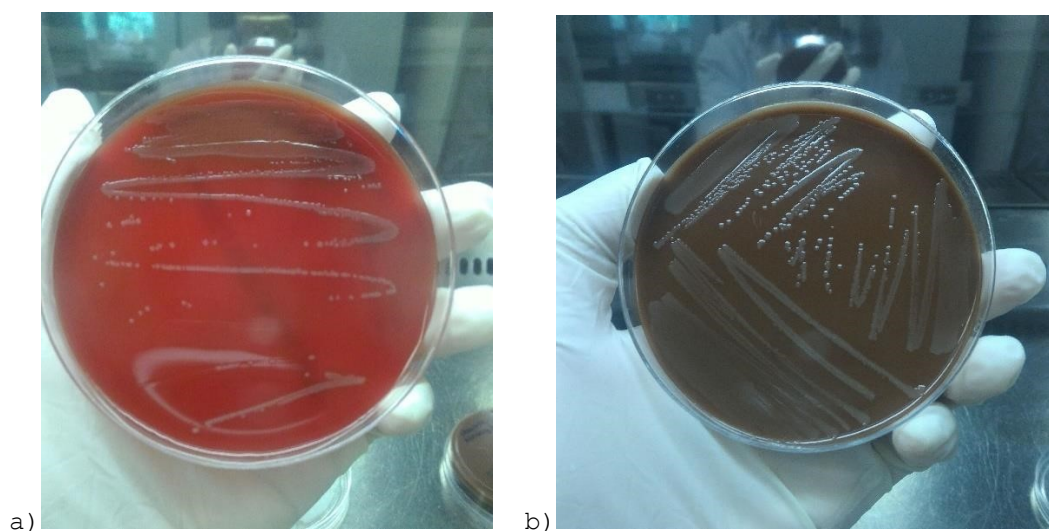


Figura 9: **Cultura de *Neisseria meningitidis***. Aspecto transparente das colônias de cepa ATCC 13090 de *Neisseria meningitidis*. a) Crescimento em meio ágar sangue, b) crescimento em ágar chocolate. Fonte: Laboratório de vírus UFMG, 2017.

No entanto, a cultura requer pelo menos um dia ou mais, e tem sensibilidade limitada. As sensibilidades de cultura do LCR tipicamente variam entre 70% e 90%, com variação no caso de critérios de inclusão, características do paciente, práticas laboratoriais e espectro de patógenos bacterianos que provavelmente contribuem para as diferenças observadas. A administração de antibióticos antes da punção lombar é uma situação comum que conduz ao rendimento reduzido da cultura. Na prática, a punção lombar pode ser adiada, resultando em antibióticos dado antes da coleta do LCR. A administração de antibióticos orais antes da admissão também pode ocorrer se o paciente previamente procurou tratamento ambulatorial ou se os antibióticos estão disponíveis sem uma receita médica (WU, 2013).

4.1.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de amplificação em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional, representa grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, particularmente por facilitar sobremaneira as tarefas de quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica (LADEIRA, 2011).

A reação é baseada em um alvo de DNA, que é amplificado exponencialmente através da repetição de três etapas principais: 1) desnaturação da cadeia dupla de DNA em cadeia de DNA simples; 2) anelamento dos iniciadores para as sequências alvo complementares de cadeia simples; e 3) extensão dos iniciadores na direção 5' para 3' pela DNA polimerase termo-estável para produzir moléculas de DNA de cadeia dupla. O número de cópias de moléculas de DNA é duplicado em cada etapa de extensão, gerando milhões de cópias das moléculas de DNA originais quando a PCR é completada (figura 10) (WHO, 2011).

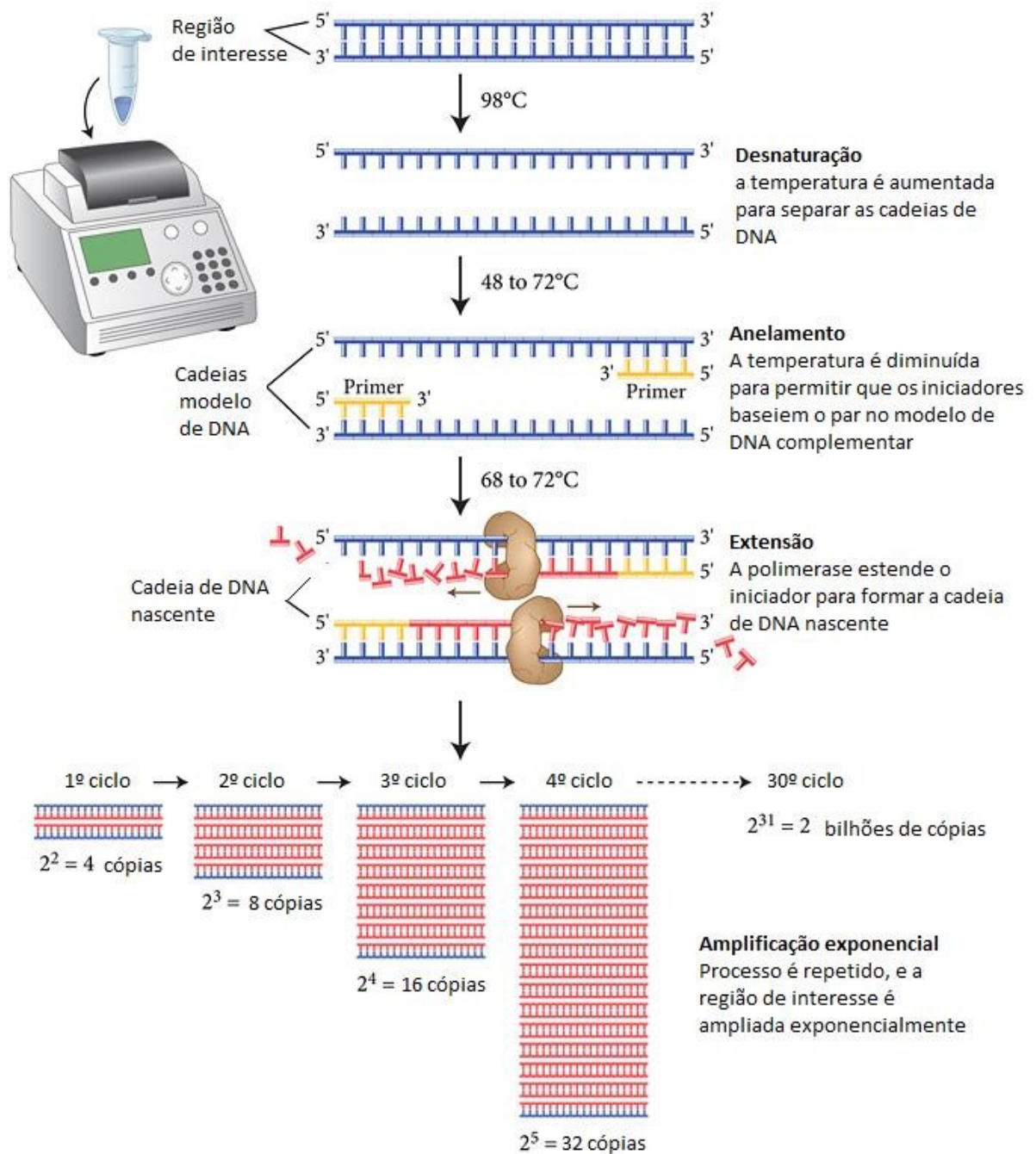


Figura 60: **Etapas da reação do PCR em tempo real.** a) Desnaturação, extensão e pareamento. Fonte: a) A. Mesut Erzurumluoglu, 2016. Population and family based studies of consanguinity: Genetic and Computational approaches. PhD thesis. University of Bristol

A PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa ou PCR em tempo real quantitativa ou simplesmente qPCR, combina amplificação e detecção em um passo através do uso de corantes fluorescentes, permitindo o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais rápida.

Os métodos de PCR mostraram-se rápidos, sensíveis, altamente específicos e mais baratos que os métodos convencionais. Podem ser facilmente adotados por laboratórios públicos de países em desenvolvimento para fins de diagnóstico.

Atualmente, a qPCR, bem como a PCR convencional tornaram-se métodos mais precisos e sensíveis para detecção de patógenos bacterianos, particularmente em pacientes que previamente receberam antimicrobianos (DIAWARA et al, 2016).

A técnica de qPCR tem sido utilizada no auxílio diagnóstico para as meningites bacterianas por ser um método rápido e sensível, além do tratamento imediato do paciente com antimicrobiano não interferir no resultado do teste laboratorial.

Embora a cultura seja considerada o padrão-ouro para confirmação de casos, a taxa positiva é relativamente baixa devido a condições de armazenamento e transporte, prática laboratorial e/ou tratamento antibiótico administrado antes da amostra ser coletada (WHO, 2011).

Dentre as várias características citadas, a técnica de qPCR utiliza um volume extremamente pequeno do material biológico.

Segundo a OMS, a PCR convencional detecta produtos no ponto final da amplificação do DNA visualizando *amplicons* usando eletroforese em gel de agarose. A detecção baseada em gel requer que os tubos que contenham *amplicons* de PCR sejam abertos e manipulados, aumentando assim o risco de contaminação de laboratório, equipamentos e reagentes com materiais amplificados. A PCR convencional também é muito demorada e menos sensível e específica do que o PCR em tempo real.

Encontram-se, no mercado diversos *kits* para diagnóstico moleculares para a identificação dos agentes etiológicos da meningite. A Biometrix Diagnóstica fornece o kit XGEN Multi MB que detecta *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, enquanto o *kit* da Seegene, Seeplex, detecta (6 tipos de DNA virus HSV1, 2, CMV, EBV, VZV, HHV6 e RNA virus HEV e 5

bactérias *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Group B Streptococcus*, *Listeria monocytogenes*) por qPCR.

Nesses ensaios moleculares dois genes podem ser direcionados em ensaios específicos de *N. meningitidis*, *ctrA* e *sodC*. O transporte de cápsulas para o gene de superfície celular, *ctrA*, é altamente conservado entre os isolados responsáveis por infecções meningocócicas invasivas e tem sido usado tanto em PCR em tempo real como convencional para detectar *N. meningitidis*. É um gene dentro do *locus* (local fixo num cromossomo onde está localizado determinado gene ou marcador genético) que codifica a cápsula. No entanto, uma vez que pelo menos 16% dos meningococos faltam *ctrA*, um ensaio de PCR em tempo real para detectar todos os meningococos, independentemente do estado de encapsulamento, foi recentemente desenvolvido e validado. Este ensaio visa o gene Cu, Zn superóxido dismutase, *sodC*, que não está geneticamente ligado ao locus da cápsula. O ensaio *sodC* detecta meningococos encapsulados, mas também é útil para detectar meningococos não combináveis que não contenham *ctrA* intacta. Por este motivo, recomenda-se que a *sodC* seja usada para a detecção de *N. meningitidis*, se possível (WHO, 2011).

Segundo Higa (2013), o qPCR baseado em *sodC* é 7,5% menos sensível do que *CtrA* em fluidos corporais normalmente estéreis.

A organização genética do *locus* da cápsula é conservada entre os sorogrupos. Os genes de expressão da cápsula estão localizados em quatro *operons*: um que codifica a biossíntese da cápsula (denominado genes *syn* ou *sia*, dependendo do sistema de nomenclatura utilizado) e três que codificam o transporte da cápsula para as proteínas da superfície celular (*ctr*). Os produtos genéticos do operon *ctr* compartilham alta similaridade com os transportadores dependentes de ATP da família ABC e são altamente conservados entre os principais sorogrupos causadores de doenças e o sorogrupo X. Os ensaios de PCR sensíveis em tempo real que visam *ctrA*, que é o primeiro gene no operon de transporte de cápsulas, foram desenvolvidos para a detecção de todos as *N. meningitidis* encapsulados e não encapsulados (não combináveis) (WHO, 2011).

O *CgrA* é outro alvo aplicado no método de PCR, gene que codifica um regulador induzível LysR type (os reguladores transcricionais do tipo LysR são a família mais bem caracterizada do grupo de reguladores transcricionais. Eles são

altamente conservados e abundantes entre as bactérias). Os iniciadores *crgA* utilizados podem reagir de forma cruzada quando testados com DNA *H. influenzae* não-tipável.

O gene alvo *NspA*, refere-se a proteína A de superfície, utilizado também na técnica de PCR. Porém apenas na metodologia convencional, devido ao tamanho do fragmento de 200 bp (FILIPPIS, 2016).

5.0 PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

A infecção pela *Neisseria meningitidis* ocorre em todo o mundo como uma doença endêmica, sendo no Brasil com ocorrência periódica de surtos epidêmicos em vários municípios. Devido a grande proporção de meningites notificadas sem identificação do agente etiológico, a incidência real da doença meningocócica em nosso meio provavelmente deve ser maior que a rotineiramente relatada.

Segundo dados do Ministério da Saúde, em 2016, foram notificados 1.083 casos de doença meningocócica no país, sendo que as regiões Sudeste (640 casos) e Sul (185 casos) apresentaram os maiores números de notificações.

A doença meningocócica acomete indivíduos de todas as faixas etárias, porém aproximadamente 50% dos casos notificados no país ocorrem em crianças menores de 5 anos de idade. A letalidade da doença, infelizmente, ainda é bastante elevada, situando-se de 18 a 20 % nos últimos anos, a despeito de todas as melhorias que obtivemos na assistência à saúde nesse período.

O diagnóstico inicial da doença meningocócica é clínico, feito por exclusão de outras doenças, já que seus primeiros sintomas são inespecíficos, tornando o diagnóstico geralmente laborioso. O diagnóstico laboratorial é feito a partir da análise e cultura de amostras de sangue e de líquido. Três sinais clínicos são classicamente relevantes: rigidez de nuca, febre alta e alteração do estado mental. No entanto, as três características só estão conjuntamente presentes em menos da metade dos casos. Em crianças muito novas, o diagnóstico pode ser mais difícil porque não há queixas de dor de cabeça e a rigidez da nuca.

A antibioticoterapia deve ser realizada o quanto antes e muitas vezes são administrados ao paciente vários antibióticos ao mesmo tempo. A técnica de qPCR auxilia nesse requisito, uma vez que mesmo quando administrado o medicamento, o agente etiológico pode ser detectado, além da rapidez na execução do teste.

Com isso, há a necessidade de um diagnóstico rápido e preciso para detecção da doença meningocócica, o que é oferecido pela técnica de qPCR, além de ser necessário um volume pequeno do material biológico para análise.

Apenas dois laboratórios no país LACEN (estados RS, SC, PR, RJ, MG, CE, AL, AM, GO, PE, BA, MS, DF, PA, SE, PI) e INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) executam essa técnica e é de extrema importância a abrangência do diagnóstico, controle e tratamento da doença.

Esses estudos e a implementação do PCR em tempo real, contribuirão para área médica e para os pacientes, uma vez que a realização desse teste em escala industrial facilitará o acesso ao rápido diagnóstico e, posteriormente, o tratamento eficaz e melhor controle da doença, além de contribuir para o crescimento científico e econômico da empresa Hermes Pardini.

6.0 OBJETIVOS

Desenvolver um método de diagnóstico por PCR tempo real (qPCR) para a detecção do principal agente etiológico causador da meningite bacteriana, a *Neisseria meningitidis*.

6.1 Objetivos específicos:

- ✓ Padronizar o método PCR em tempo real para detecção do agente *Neisseria meningitidis* através do fluoróforo SYBR® Green em LCR.
- ✓ Detectar por PCR em tempo real *Neisseria meningitidis* em liquor de crianças com suspeita de meningite do Hospital João Paulo II

7.0 METODOLOGIA

7.1 Amostras clínicas

Após a padronização, as amostras clínicas de pacientes com suspeita clínica de meningoencefalite de LCR foram testadas. As amostras de líquido foram coletadas pelo Hospital Infantil João Paulo II, aprovadas conforme comitê de ética do hospital número 132/2009, e levadas pelo grupo de pesquisa sobre meningoencefalites coordenada pela professora Erna G. Kroon, para a UFMG. Nesse trabalho foram utilizadas 204 amostras de líquido.

7.2 Preparo das amostras e extração de DNA

Foram utilizadas duas formas de extração do DNA, primeiramente por aquecimento em banho maria a 100°C durante 10 minutos (OMS, 2011) e pelo kit comercial Roche (High Pure™ Viral Nucleic Acid Kit (Belo Horizonte, Brasil) seguindo-se as instruções do fabricante. Resumidamente, 200 µL LCR foram adicionados a 200 µL de solução de trabalho e 50 µL de solução com proteinase K reconstituída. Imediatamente a reação foi homogeneizada e incubada durante 10 min a 72° C. Após a incubação, foi acrescentado 100 µL de isopropanol. Foi transferido para a coluna e então centrifugado por 1 min a 10.000 rpm (aprox. 8000 x g). Após centrifugação foi adicionado 450 µl de tampão de lavagem e novamente realizado a centrifugação por 1 min a 10.000 rpm (aprox. 8000 x g). Foi realizado essa lavagem por 3 vezes e por fim centrifugado por 13.000 x g por 10 segundos. O DNA foi eluído com 50 µl de tampão de eluição e armazenado a 4°C até sua utilização.

7.3 Cultivo de bactérias

O crescimento bacteriano da amostra de referência (cepa ATCC 13090 e amostra identificada como positiva para *Neisseria meningitidis*) foi realizado com meio agár sangue e ágar chocolate suplementado (Biomerieux) e incubado em estufa à 37°C na presença de CO₂ por 24 horas.

7.4 Utilização de escala Mc Farland

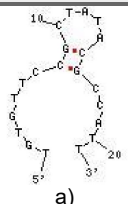
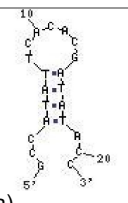
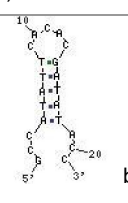
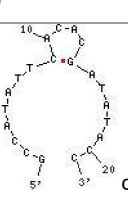
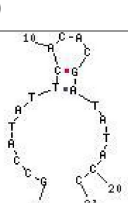
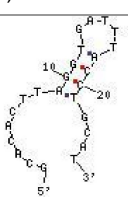

Para o teste de sensibilidade, foi utilizado o padrão McFarland *Turbidity Standard* No. 0,5 BD que corresponde aproximadamente a uma suspensão homogênea de $1,5 \times 10^8$ células por mL. Essa escala, é feita com uma suspensão de sulfato de bário que tem por finalidade simular a concentração bacteriana do inóculo a ser utilizado durante um processo. É utilizada, principalmente, na padronização de inóculos bacterianos na confecção do antibiograma, concentração inibitória mínima (C.I.M.) e outros testes qualito-quantitativos. Foi utilizado a amostra controle ATCC 13090 *Neisseria meningitidis* e solução tampão (fosfato-salino) para ajustar a concentração no padrão 0,5. Partindo desse padrão foram realizadas diluições seriadas até 10^{-9} para realização de cultivo bacteriano e qPCR de todas as diluições, inclusive da concentração inicial de 0,5 da escala.

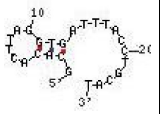
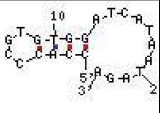
7.5 PCR em Tempo Real (qPCR)

7.5.1 Seleção e desenho de iniciadores específicos

Foi feita uma ampla pesquisa na literatura em busca de iniciadores específicos, e foi utilizado como referência principal o Manual da Organização Mundial da Saúde, 2011, no qual foram baseados a seleção dos iniciadores para os genes *CtrA* e *SodC* de *Neisseria meningitidis*. A especificidade dos iniciadores para o agente infeccioso alvo foi feito por análise *in silico*, com o auxílio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O tamanho dos iniciadores, o conteúdo de G+C, a temperatura de dissociação dos iniciadores e a formação de estruturas secundárias foram avaliados através do programa Oligoanalyser (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>) (tabela 2). A análise do tamanho do DNA amplificado encontra-se na tabela 3. Os iniciadores (IDT Integrated DNA Technologies: NM *CtrA*, NM *SodC*) foram diluídos para a concentração de 200 μ M, utilizando o tampão Tris EDTA. Para solução de uso nas reações, a concentração armazenada foi de 10 μ M.

Tabela 2: Análise estrutural e comportamental dos iniciadores CtrA e SodC.

<i>Iniciador</i>	<i>Sequência/ complemento</i>	<i>Tamanho</i>	<i>Conteúdo G+C (%)</i>	<i>Temperatura de fusão (°C)</i>	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	<i>Estruturas secundárias</i>
CtrAF753	5'-TGTGTTCCGCTATACGCCATT -3' 5'- AATGGCGTATAGCGGAACACA-3'	21	47,6	56,8	-0,64	
CtrAR846	5'-GCCATATTCACACGATATACC -3' 5'- GGTATATCGTGTGAATATGGC -3'	21	42,9	50,7	0,91	
					1,08	
					1,17	
					1,41	
SodC F351	5'-ACACTTAGGTGATTTACCTGCAT-3' 5'-TGCAGGTAAATCACCTAAGTGTGC-3'	25	44	57,4	-2,76	
					-2,31	

					-1,44	
SodC R478	5'- CCACCCGTGTGGATCATAATAGA -3' 5'- TCTATTATGATCCACACGGGTGG -3'	23	47,8	56,2	-2,73	

Fonte: Oligoanalyser (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>)

Tabela 3: **Tamanho do DNA amplificado.** Exemplo de sequência analisada para verificação do tamanho do DNA amplificado.

Alvo	Iniciador	Sequência	ID Gene	Região	Região	Tamanho	Estrutura do DNA amplificado
CtrA	F753	TGTGTTCCGCTATACGC CATT	CP016886.1	1167600	1167620	114 pb da região 1167600 a 1167713	>CP016886.1:1167600-1167713 Neisseria meningitidis strain M25074 genome TGTGTTCCGCTATACGCCATTGG TGGAATTGCCG GCAGAACGTCA GGATAAATGGA TTGCTCAAGGTT ATGGCAGTGAG GCAGAGATTCC AACGGTATATC GTGTGAATATG GC
	R846	GCCATATTCACACGATA TACC		1167713	1167693		
SodC	F351	GCACACTTAGGTGATT ACCTGCAT	CP016884.1	1141035	1141011	128 pb de região da base 1140908 a 1141035.	>CP016884.1:1140908-1141035 Neisseria meningitidis strain M22797 genome CCACCCGTGTG GATCATAATAGA GTGACCGCAA CATCATCTAAAT GTTTAAGACGT GGTGCTAAAAC AGGATTTGTTGC TGTGCCATCAT GCAATACAGTTA ATGCAGGTAAAT CACCTAAGTGT GC
	R478	CCACCCGTGTGGATCAT AATAGA		1140908	1140930		

7.5.2 Controles para os testes moleculares qPCR

Como controle foi usada a amostra *Neisseria meningitidis* (ATCC 13090), inoculada em meio para crescimento microbiológico ágar sangue e ágar chocolate (Biomérieux, Belo Horizonte, Brasil) em temperatura 37°C, na presença de CO₂. A bactéria foi armazenada em caldo Brucela (HIMEDIA, Belo Horizonte, Brasil) com 10% de glicerol sob congelamento. Como controle negativo foi utilizado água reagente.

7.5.3 Reação

A reação foi padronizada com 10 µL, mix Promega GoTaq® (5 µL), iniciador senso (0,1 µM = 0,1 µL), iniciador anti-senso (0,1 µM = 0,1 µL), água (3,8 µL), 1 µL amostra biológica (líquor). As reações de qPCR foram feitas com diluição das amostras 1:10. Foram feitos 40 ciclos com as padronizações nas seguintes temperaturas: 95°C 10 minutos no ciclo inicial e depois, 95°C 15 segundos, 60°C 1 minuto. As reações de PCR foram feitas em termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), utilizando o sistema SYBR® Green. Os experimentos foram feitos em duplicatas utilizando placa de 48 poços. Os resultados foram analisados com o auxílio do software 7500 Fast v 2.01 (Applied Biosystems, EUA). Para padronização do controle e posteriormente o teste nas amostras biológicas, foram realizadas diluições seriadas 1:10, 1:100 e 1:1000 do controle ATCC 13090 de *Neisseria meningitidis* de DNA previamente liberado por aquecimento.

8.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Análise para seleção dos iniciadores

A análise do Blast foi feita para buscar a especificidade dos iniciadores com o microrganismo de interesse. A sequência do iniciador senso, baseado no gene CtrA (F753) apresentou similaridade com o agente bacteriano *Peptoclostridium difficile*.

O *Peptoclostridium difficile*, inicialmente chamado *Bacillus difficilis*, foi primeiro isolado do mecônio de recém-nascidos por Hall e O'Toole em 1935. O gênero *Peptoclostridium*, do filo *Firmicutes*, classe *Clostridia*, ordem *Clostridiales* e família *Peptostreptococcaceae*, caracteriza-se por bactérias gram positivas estritamente anaeróbicas, móveis e pleomórficas. Até o final da década de 1970, *Peptoclostridium difficile* não era reconhecido como bactéria patogênica. No entanto, nesta década, suas toxinas foram detectadas em conteúdos fecais de pacientes humanos com colite pseudomembranosa e a doença foi reproduzida em hamsters, confirmando a importância deste microrganismo como enteropatógeno. Hoje, esta bactéria é conhecida como a principal causa de diarreia nosocomial em humanos em todo o mundo e uma possível causa de diarreia na comunidade em geral (PEREIRA, 2016).

Apesar da pesquisa do Blast ter evidenciado uma similaridade com outro agente microbiano, *Peptoclostridium difficile* não interfere no teste por ser um microrganismo com habitat diferente do microrganismo alvo, *Neisseria meningitidis*.

Outra evidência no Blast foi a confirmação da ocorrência de hibridização e a especificidade dos pares de iniciadores e o microrganismo-alvo *Neisseria meningitidis* (Figura 11), que apresentou 100% de identidade com a sequência alvo. Os baixos valores de *E-value* confirmam uma baixa probabilidade do alinhamento ter ocorrido ao acaso. O *score*, que fornece informação sobre o grau de similaridade entre a sequência em questão e a sequência que introduzimos (query), obteve valores altos que indicam o grau de similaridade.

a) *Neisseria meningitidis* Ctra senso F753

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Neisseria meningitidis strain M10208, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP009422.1
Neisseria meningitidis strain NM3683, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP009421.1
Neisseria meningitidis strain NM3682, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP009420.1
Neisseria meningitidis M7124, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP009419.1
Neisseria meningitidis strain CMCC29013 capsular gene cluster, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HQ437684.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_W135, strain ST-11	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562992.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146495, strain ST-4443	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562991.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146504, strain ST-166	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562990.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146505, strain ST-23	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562989.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146501, strain ST-765	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562988.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_W135, strain ST-22	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562987.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146502, strain ST-963	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562986.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146498, strain ST-8724	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562985.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146499, strain ST-5594	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562984.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146496, strain ST-4959	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562983.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146497, strain ST-254	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562982.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146500, strain ST-8723	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562981.1

b) *Neisseria meningitidis* Ctra anti-senso R846

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Neisseria meningitidis M0579, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP007668.1
Neisseria meningitidis strain B6116/77, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP007667.1
Neisseria meningitidis LNP21362, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP006869.1
Neisseria meningitidis strain M10208, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP009422.1
Neisseria meningitidis strain NM3683, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP009421.1
Neisseria meningitidis strain NM3682, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP009420.1
Neisseria meningitidis M7124, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP009419.1
Neisseria meningitidis strain NM3686, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP009418.1
Peptoclostridium difficile genome assembly 7032989_scaffold BN1095_Contig_374	42.1	42.1	100%	0.051	100%	LK933043.1
Neisseria meningitidis strain 510612, complete genome	42.1	42.1	100%	0.051	100%	CP007524.1
Neisseria meningitidis strain CMCC29013 capsular gene cluster, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HQ437684.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_W135, strain ST-11	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562992.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146495, strain ST-4443	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562991.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146504, strain ST-166	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562990.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146505, strain ST-23	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562989.1
Neisseria meningitidis capsule locus gene cluster CPS_146501, strain ST-765	42.1	42.1	100%	0.051	100%	HF562988.1

c) *Neisseria meningitidis* SodC senso F351

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Neisseria meningitidis strain NM3686, complete genome	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	CP009418.1
Neisseria meningitidis strain alpha522 draft genome, contig CONTIG_17	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	FR845709.1
Neisseria meningitidis M04-240196, complete genome	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	CP002423.1
Neisseria meningitidis M01-240149, complete genome	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	CP002421.1
Neisseria meningitidis H44/76, complete genome	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	CP002420.1
Neisseria meningitidis 8013, complete genome	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	FM999788.1
Neisseria meningitidis M0579, complete genome	50.1	100	100%	5e-04	100%	CP007668.1
Neisseria meningitidis strain B6116/77, complete genome	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	CP007667.1
Neisseria meningitidis strain M10208, complete genome	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	CP009422.1
Neisseria meningitidis strain NM3683, complete genome	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	CP009421.1
Neisseria meningitidis strain NM3682, complete genome	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	CP009420.1
Neisseria meningitidis M7124, complete genome	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	CP009419.1
Neisseria meningitidis strain 510612, complete genome	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	CP007524.1
Neisseria meningitidis strain M10481 Cu,Zn superoxide dismutase (sodC) gene, partial cds	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	GQ365746.1
Neisseria meningitidis serogroup B strain M10697 Cu,Zn superoxide dismutase (sodC) gene, partial cds	50.1	50.1	100%	5e-04	100%	GQ365745.1

d) *Neisseria meningitidis* SodC anti-senso R478

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Neisseria meningitidis M0579, complete genome	46.1	92.2	100%	0.005	100%	CP007668.1
Neisseria meningitidis strain B6116/77, complete genome	46.1	46.1	100%	0.005	100%	CP007667.1
Neisseria meningitidis strain M10208, complete genome	46.1	46.1	100%	0.005	100%	CP009422.1
Neisseria meningitidis strain NM3683, complete genome	46.1	46.1	100%	0.005	100%	CP009421.1
Neisseria meningitidis strain NM3682, complete genome	46.1	46.1	100%	0.005	100%	CP009420.1
Neisseria meningitidis M7124, complete genome	46.1	46.1	100%	0.005	100%	CP009419.1
Neisseria meningitidis strain NM3686, complete genome	46.1	46.1	100%	0.005	100%	CP009418.1
Neisseria meningitidis strain 510612, complete genome	46.1	46.1	100%	0.005	100%	CP007524.1
Neisseria meningitidis strain alpha522 draft genome, contig CONTIG_17	46.1	46.1	100%	0.005	100%	FR845709.1
Neisseria meningitidis strain M10481 Cu,Zn superoxide dismutase (sodC) gene, partial cds	46.1	46.1	100%	0.005	100%	GQ365746.1
Neisseria meningitidis serogroup B strain M10697 Cu,Zn superoxide dismutase (sodC) gene, partial cds	46.1	46.1	100%	0.005	100%	GQ365745.1
Neisseria meningitidis serogroup 29F strain M10949 Cu,Zn superoxide dismutase (sodC) gene, partial cds	46.1	46.1	100%	0.005	100%	GQ365744.1
Neisseria meningitidis alpha275 strain M11701 Cu,Zn superoxide dismutase (sodC) gene, partial cds	46.1	46.1	100%	0.005	100%	GQ365743.1
Neisseria meningitidis serogroup Y strain M11880 Cu,Zn superoxide dismutase (sodC) gene, partial cds	46.1	46.1	100%	0.005	100%	GQ365742.1
Neisseria meningitidis alpha275 strain M11986 Cu,Zn superoxide dismutase (sodC) gene, partial cds	46.1	46.1	100%	0.005	100%	GQ365741.1
Neisseria meningitidis serogroup A strain M12221 Cu,Zn superoxide dismutase (sodC) gene, partial cds	46.1	46.1	100%	0.005	100%	GQ365740.1

Figura 11: **Análise parcial *in silico* dos genes CtrA e SodC das sequências senso e anti-senso:** descrição (*Description*), pontuação que indica o grau de homologia entre a sequência em questão e a sequência que foi introduzida (*Score*), porcentagem da seqüência submetida ao programa que é coberta pelo alinhamento (*Query cover*), indicador do grau de significância do resultado da pesquisa, parâmetro de confiança (*E-value*), identidade máxima (*Ident*). Fonte: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

O tamanho do DNA amplificado foi analisado com a referência do manual da *Applied Biosystems*, encontrando de 114 -128 bases. Outros padrões analisados como comprimento do iniciador, Tm, conteúdo G+C, formação de *hairpin* e heter-

dímeros, complementariedade entre os iniciadores tiveram padrões de eficiência avaliados com sucesso na reação final (tabela 4).

Tabela 4: **Padrões de avaliação para eficiência no qPCR.** As análises realizadas encontraram-se parcialmente dentro dos padrões, mas com sucesso na reação final.

Padrões para eficiência no qPCR por SYBR® Green		
	Referencial	Resultados encontrados
Tamanho do DNA amplificado	50 a 150 bases para uma melhor eficiência de PCR	114 - 128 bases
Comprimento ideal do iniciador	20 bases	21 – 25 bases
Temperatura de Melt	58 °C a 60 °C (Optimal Tm – 59 °C)	50,7 - 57,4 °C
Conteúdo G+C	30 a 80%	42,9 a 47,8 %

Fonte: Getting Started Guide, Primer Express ® Software Version 3.0, AppliedBiosystems

8.2 Análise de DNA amplificado do gene CtrA

Foi feito o fracionamento em eletroforese em gel de poliacrilamida do DNA amplificado das amostras identificadas como positiva 455 e negativa 449 utilizando a extração pelo kit comercial Roche (High Pure™ Viral Nucleic Acid) e extração pós aquecimento, ambas nas concentrações pura, diluídas 1:10 e 1:100 (figura 12). O controle utilizado foi o marcador de tamanho molecular. Foi utilizado 10 µL do produto da qPCR após centrifugação da placa.

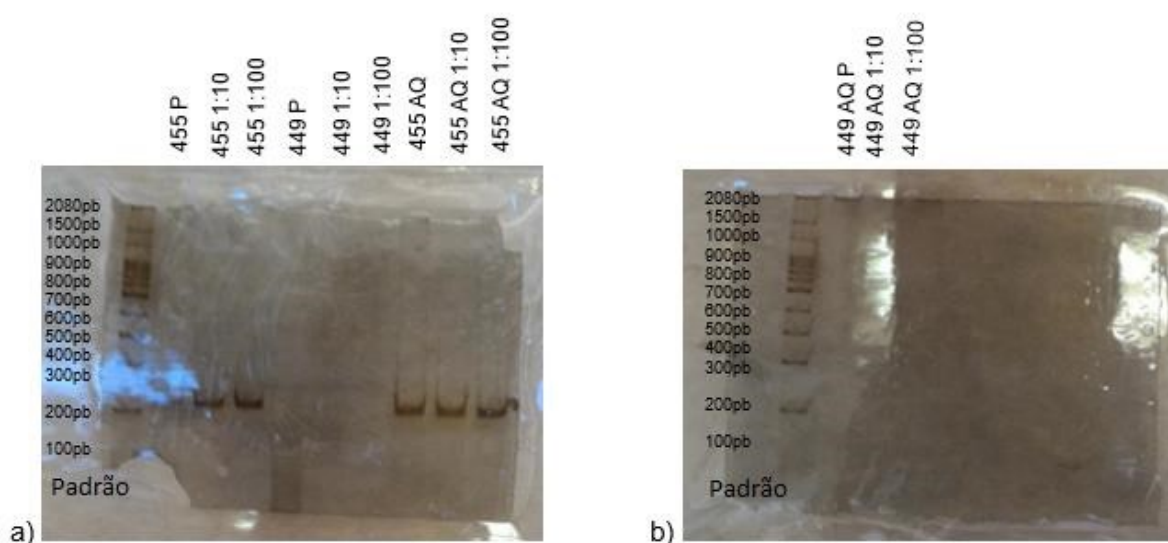


Figura 12: **Amplicação de DNA do gene CtrA de *N. meningitidis*.** a) Da esquerda para direita: padrão de tamanho molecular, amostra 455 positiva extraída com kit 455 sem diluir, 455 diluída 1:10, 455 diluída 1:100; amostra 449 negativa extraída com kit sem diluir, 449 diluída 1:10, 449 diluída 1:100; amostra 455 extraída pós aquecimento sem diluir, 455 diluída 1:10, 455 diluída 1:100. b) Da esquerda para direita: padrão de tamanho molecular, amostra extraída pós aquecimento 449 pura, 449 diluída 1:10, 449 diluída 1:100.

8.3 Sensibilidade

A sensibilidade analítica identifica a capacidade do ensaio para detectar concentrações baixas de um espécime biológico. É referida como “limite de detecção (LOD)”, ou seja, a menor concentração real do analito numa amostra que pode ser detectado de forma consistente (BURD, 2010).

Partindo do controle ATCC 13090, armazenada em meio de congelamento (caldo Brucela), foi inoculada em meio ágar chocolate para o crescimento bacteriano. As colônias crescidas foram inoculadas em escala 0,5 McFarland. Desta, foram feitas diluições seriadas (até 10^{-9}) a fim de detectar a concentração mínima do teste. Essas diluições foram plaqueadas em meio de cultura ágar sangue (Biomerieux) e foram feitas reações em qPCR.

Os padrões de McFarland foram utilizados como padrões de turvação na preparação de suspensões de microrganismos. O padrão de MacFarland 0,5 tem

aplicação particular na preparação de inóculos bacterianos para realização de testes de sensibilidade antimicrobiana.

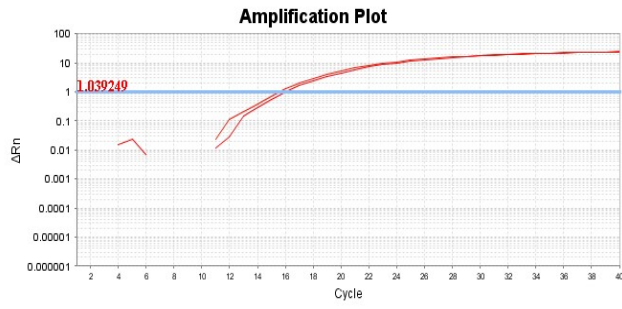
Na Tabela 5 e Figura 13, são apresentados o crescimento da bactéria em unidades formadoras de colônia e as reações em qPCR, onde houve crescimento bacteriano até a diluição 10^{-5} com crescimento de 10.000 unidades formadoras de colônia (UFC) e amplificação até a diluição 10^{-5} com um Ct de 32,42.

Tabela 5: **Plaqueamento e reações em qPCR do controle ATCC 13090 de diluições realizadas até 10^{-9} .** Crescimento bacteriano e amplificação desde a concentração de Mc Farland 0,5 até a diluição 10^{-5} .

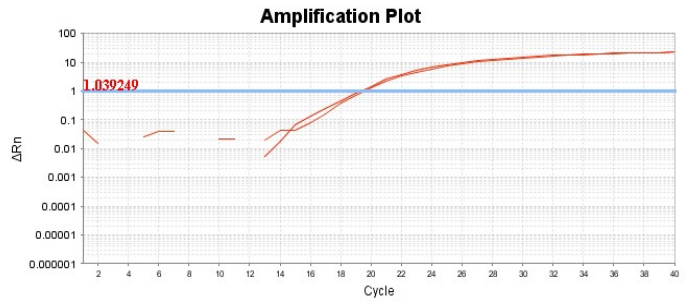
Diluição realizada	Crescimento em unidades formadoras de colônia (UFC)/mL	qPCR amplificação (Ct)
Mc farland 0,5	Maior ou igual 100.000	16,02
Diluição 10^{-1}	Maior ou igual 100.000	19,36
Diluição 10^{-2}	Maior ou igual 100.000	24,13
Diluição 10^{-3}	>100.000	25,41
Diluição 10^{-4}	~60.000	32,26
Diluição 10^{-5}	10.000	32,42
Diluição 10^{-6}	Não houve crescimento bacteriano	Não houve crescimento amplificação
Diluição 10^{-7}	Não houve crescimento bacteriano	Não houve crescimento amplificação
Diluição 10^{-8}	Não houve crescimento bacteriano	Não houve crescimento amplificação
Diluição 10^{-9}	Não houve crescimento bacteriano	Não houve crescimento amplificação

a) Mac Farland escala 0,5

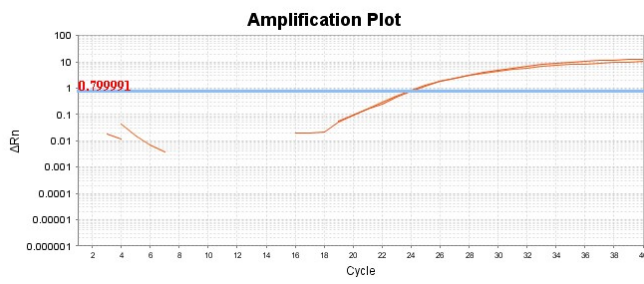
b) Diluição 10^{-1}



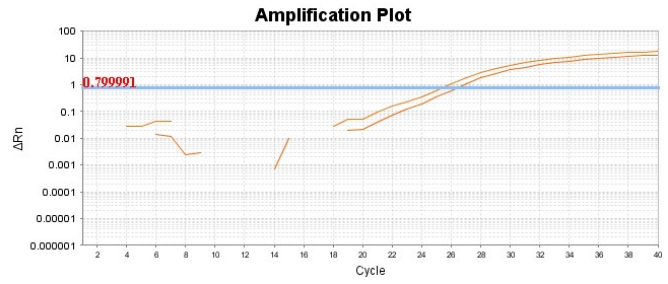
c) Diluição 10⁻²



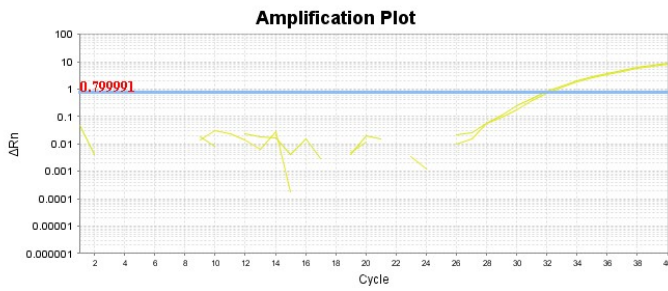
d) Diluição 10⁻³



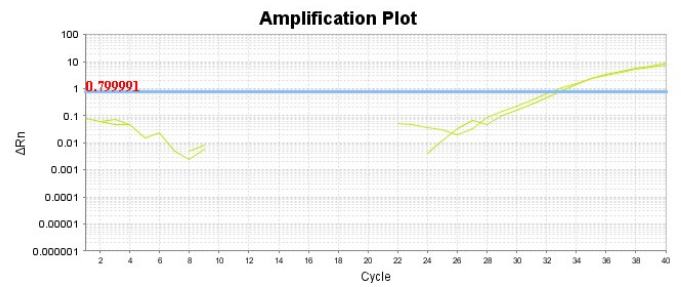
e) Diluição 10⁻⁴



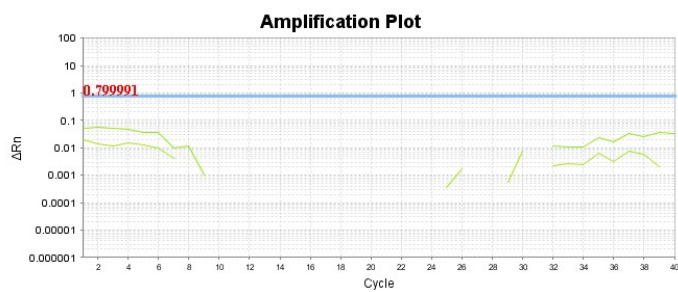
f) Diluição 10⁻⁵



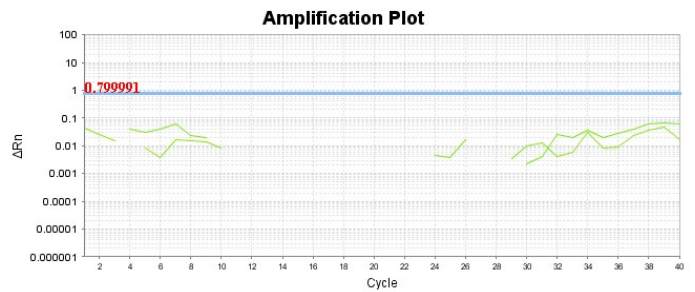
g) Diluição 10⁻⁶



h) Diluição 10⁻⁷



i) Diluição 10⁻⁸



j) Diluição 10⁻⁹

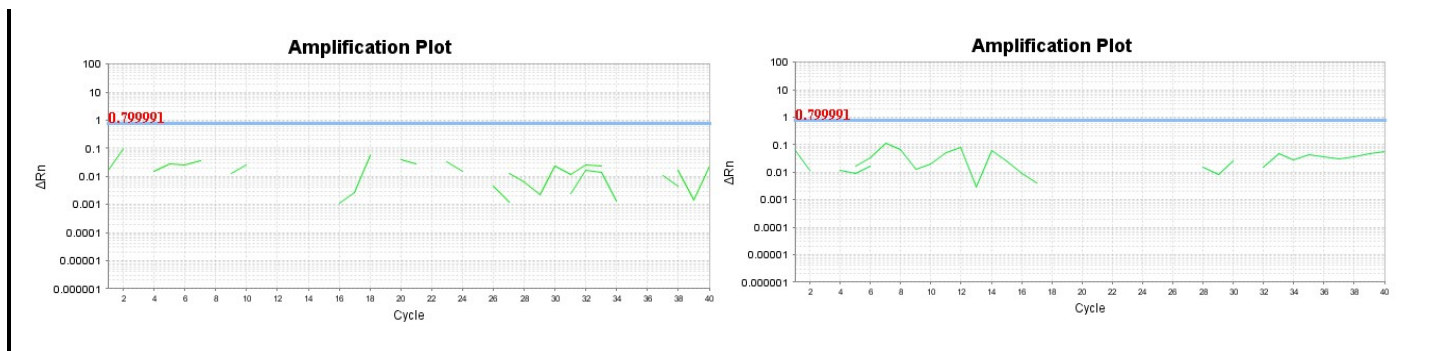


Figura 13: **Teste de sensibilidade analítica para ensaios qPCR para *Neisseria meningitidis* do gene *CtrA*.** Curvas de amplificação na escala logarítmica. a) Controle em Mac Farland escala 0,5. b) Diluição 10^{-1} . c) Diluição 10^{-2} . d) Diluição 10^{-3} . e) Diluição 10^{-4} . f) Diluição 10^{-5} . g) Diluição 10^{-6} . h) Diluição 10^{-7} . i) Diluição 10^{-8} . j) Diluição 10^{-9} .

8.4 Interferência analítica na análise do gene *CtrA*

Na interferência analítica foi avaliada a reação cruzada (potencial de outros microrganismos com estrutura genética semelhante, como a *Neisseria gonorrhoeae*) com potencial de amplificação do iniciador em estudo.

A escolha da *Neisseria gonorrhoeae* se deve por ter relação estreita ao nível da organização genética e do DNA sequência com *Neisseria meningitidis*. A maioria dos genes estudados em uma dessas bactérias foi encontrada para ter seus homólogos no outro. Da mesma forma, a maioria dos fatores de virulência até agora identificados em *Neisseria meningitidis* têm uma contrapartida em *Neisseria gonorrhoeae*, isto é, pilina, proteínas PilC, porinas, proteínas de opacidade, lactoferrina e receptores de transferrina (TINSLEY e NASSIF, 1996).

A espécie *Neisseria gonorrhoeae* foi obtida de amostra clínica de paciente, devidamente identificada no Instituto Hermes Pardini.

Foi feita uma reação de qPCR utilizando como controle positivo *Neisseria meningitidis* (cepa ATCC 13090) e diluições da bactéria *Neisseria gonorrhoeae* até o fator 10^{-5} .

Não houve nenhuma amplificação nas diluições testadas, comprovando a especificidade do iniciador *CtrA*.

8.5 Acurácia

A acurácia é a forma de comparar o desempenho por métodos diferentes (cultura, coloração de Gram, aglutinação em látex), com variação nas condições laboratoriais, analista, método e equipamento. Foi realizado um estudo comparativo com os exames correlacionados realizados nas amostras de líquido do hospital João Paulo II.

O total de 6 amostras identificadas como positivas através da metodologia qPCR dentre as 204 amostras de líquido obtidos do Hospital João Paulo II, tiveram seus prontuários analisados. As amostras positivas foram identificadas da seguinte forma: 616, 658, 462, 743, 442, 455. Estão apresentadas na tabela 6 as análises bioquímicas e na tabela 7 as análises microbiológicas/sorológicas

Tabela 6: **Dados obtidos do protocolo laboratorial.** Exames laboratoriais bioquímicos realizados no líquido.

Análise Bioquímica				
Identificação	Glicose* (mg/dL)	Proteína* (mg/dL)	Lactato* (mg/dL)	Cloreto* (mEq/L)
455	20	153,9	9,66	NT
616	26	218	2,6	NT
658	10,0	199,28	NT	121,7
462	53	152	1,56	NT
743	26	226,0	5,9	NT
442	9,0	125,94	NT	144,3

NT: Não testado

*Valores de referência: Não informado pelo Hospital João Paulo II

Tabela 7: **Dados obtidos do protocolo laboratorial.** Exames laboratoriais microbiológicas/sorológicas

LCR	Cultura	Látex	Gram	Hipótese Diagnóstica
455	<i>Neisseria meningitis</i>	Positivo para <i>N. meningitidis</i> Y - W 135	Presença de numerosos diplococos gram negativos > 20 por campo	Meningite bacteriana por <i>N. Meningitidis</i> Y/W 135 e meningocemia
616	Negativa	Negativo	Ausência de germes coráveis pelo gram	Meningoencefalite de etiologia não definida, complicada com empiema, em tratamento com Cefotaxima e Vancomicina (Pneumococo resistente?) em melhora clínica progressive
658	*	*	*	Ausência de protocolo: foi realizado alguns testes na plataforma Hermes Pardini como via de comparabilidade
462	Negativa	Positivo para <i>Neisseria Meningitidis</i> C	Raros diplococos	Meningite meningocócica C e distúrbio de coagulação
743	Negativa	Negativo	Negativo	Meningite bacteriana sem etiologia definida
442	*	*	*	Ausência de protocolo: foi realizado alguns testes na plataforma Hermes Pardini como via de comparabilidade

*Ausência de protocolo do Hospital João Paulo II, realizados testes bioquímicos com positividade nas duas amostras testadas.

8.6 Testes de amostras clínicas

Foram analisadas 204 amostras de líquido com o iniciador CtrA, sendo este mais específico. O iniciador complementar, SodC, foi testado na amostra controle 455

devidamente identificada positiva, no controle de cepa ATCC 13090 e nas amostras que obtiveram amplificação com o iniciador CtrA, obtendo-se positividade em todos eles.

A positividade do estudo foi de 2,9 % do total de amostras testadas e compatível com o diagnóstico clínico e laboratorial realizado pelo Hospital João Paulo II. Segundo os dados do Hospital, não foram todas as amostras positivas neste estudo que tiveram diagnóstico específico para a meningite meningocócica pelos testes usados, o que comprova a especificidade e importância no auxílio diagnóstico do qPCR (tabela 8).

Tabela 8: **Amostras testadas, positividade com outros testes e diagnóstico médico.** O grupo I refere-se as amostras negativas. O grupo II refere-se as amostras positivas pelo qPCR.

Grupo	Identificação	Material	Látex	Cultura	Exames Bioquímicos	Gram	Diagnóstico
I	*	LCR	*	*	*	*	*
(n = 198)							
	455	LCR	+	+	+	+	Meningite bacteriana por <i>N. Meningitidis</i> Y/W 135 e meningocemia
	616	LCR	-	-	+	-	Meningoencefalite de etiologia não definida
II							
(n = 6)	658	LCR	Ausência de protocol	Ausência de protocolo	+	Ausência de protocolo	Ausência de protocolo
	462	LCR	+	Teste não realizado	+	+	Meningite meningocócica C e distúrbio de coagulação
	743	LCR	-	-	+	-	Meningite bacteriana sem etiologia definida
	442	LCR	Ausência de protocol	Ausência de protocolo	+	Ausência de protocolo	Ausência de protocolo

*Não tiveram dados do protocolo e/ou não foram realizados testes comparativos

9.0 Conclusões

A qPCR foi desenvolvida como auxílio diagnóstico que, associados a outros métodos já utilizados em rotina laboratorial, para colaborar e agilizar o diagnóstico do paciente, especialmente nos casos em que existe a suspeita clínica da doença, na qual não há confirmação do agente etiológico.

No presente estudo, foi avaliado a capacidade diagnóstica da qPCR que detecta o DNA de *N. meningitidis* em amostras de líquor bem como sua padronização.

O trabalho constituiu-se de 2 etapas principais. A primeira etapa correspondeu a extensa revisão bibliográfica sobre o agente bacteriano e iniciadores alvo. A segunda etapa foi verificar o desempenho da técnica estudada no diagnóstico etiológico em comparação aos métodos considerados convencionais. Na primeira etapa, esse estudo evidenciou a especificidade *in vitro* dos iniciadores alvo CtrA e SodC através do alinhamento com o agente bacteriano, além da avaliação positiva dos padrões de eficiência para a reação de qPCR.

Em contrapartida com Higa et al. 2013, houve 100 % de compatibilidade das amostras positivas utilizando o iniciador CtrA e SodC para as amostras de líquor. Em seu estudo o qPCR obteve resultados 7,5 % menos sensível com SodC nas amostras de líquor.

Na segunda etapa, foi padronizada a reação, na qual comprovou os estudos *in vitro* e chegou-se a um diagnóstico mais preciso do que os outros métodos realizados no Hospital João Paulo II.

Nota-se que o qPCR para *Neisseria meningitidis* é de grande valia no auxílio diagnóstico devido sua rapidez na execução da técnica e liberação do laudo para o paciente bem como a maior especificidade do método. Conforme demonstrado no estudo, houveram amostras em que não se chegou no microrganismo patogênico mas que pelo qPCR teve sua detecção comprovada.

Portanto, a estratégia desenvolvida no presente estudo permitiu uma redução do tempo para a detecção e identificação do agente microbiano, além da melhor especificidade em relação aos testes convencionais usualmente utilizados, principalmente amplificação e maior acesso ao diagnóstico laboratorial.

10.0 Perspectivas

A técnica da qPCR foi desenvolvida para ser aplicada no diagnóstico de meningite meningocócica, porém tem-se como perspectivas a aplicação da técnica para meningite pneumocócica e por *Haemophilus influenzae* em uma única reação multiplex.

A identificação dos 3 principais agentes bacterianos causadores da meningite em uma única reação, facilita o diagnóstico etiológico e antecipa o tratamento eficaz do paciente.

Com isso tem-se como testes futuros:

- ✓ Validação e padronização do método PCR em tempo real para detecção dos outros agentes causadores da meningite bacteriana *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* através do fluoróforo SYBR® Green.
- ✓ A partir da padronização do PCR em tempo real de cada agente bacteriano acima, realizar a junção dos 3 principais agentes causadores da meningite bacteriana: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* e incluir a utilização de sonda *Taqman* (amplamente utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas).
- ✓ Validação e padronização da reação multiplex para detecção dos três agentes bacterianos.
- ✓ Realizar os testes na plataforma do Instituto Hermes Pardini.
- ✓ Implementação na rotina laboratorial do Instituto Hermes Pardini.

Referências

ANDRADE AL, MINAMISAVA R, TOMICH LM, LEMOS AP, GORLA MC, DE CUNTO BRANDILEONE MC, DOMINGUES CMS, DE MORAES C, POLICENA G, BIERRENBACH AL; Meningococcal Study Group. Impact of meningococcal C conjugate vaccination four years after introduction of routine childhood immunization in Brazil. **Vaccine**, v. 35, p. 2025-2033, 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. **Situação epidemiológica da doença meningocócica, Brasil, 2007-2013**. PORTAL DA SAÚDE, VOLUME 47, NÚMERO 29, 2016. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE- MINISTÉRIO DA SAÚDE.

BURD EM. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. **Clin Microbiol Rev**, v.23, p. 550–576, 2010.

COMAR SR, MACHADO NA, DOZZA TG, HASS P. Análise citológica do líquido cefalorraquidiano. **Estud Biol**, v. 31, p. 93-102, 2009.

DE FILIPPIS I, DE ANDRADE CF, CALDEIRA N, DE AZEVEDO AC, DE ALMEIDA AE. Comparison of PCR-based methods for the simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in clinical samples. **Braz J Infect Dis**, v. 20, p. 335-341, 2016.

DE MORAES C, DE MORAES JC, DA SILVA GDM, DUARTE EC. Evaluation of the impact of serogroup C meningococcal disease vaccination program in Brazil and its regions: a population-based study, 2001-2013. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, vol. 112, p. 237-246, 2017.

DIWARA I, KATFY K, ZEROUALI K, BELABES H, ELMDAGHRI N. A duplex real-time PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid. **J Infect Dev Ctries**, v. 10, p. 53-61, 2016.

DIMAS LF, SOHLER MP. Exame do líquido cefalorraquidiano: influência da temperatura, tempo e preparo da amostra na estabilidade analítica. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.44, p. 97-106, 2008.

DISPONÍVEL EM: <http://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/fluorescence-reader-for-microfluidic-qpcr/>. ACESSO EM: 31/01/2018.

DONKOR ES. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, p.7, 2013.

DORAN KS, FULDE M, GRATZ N, KIM BJ, NAU R, PRASADARAO N, SCHUBERT-UNKMEIR A, TUOMANEN EI, VALENTIN-WEIGAND P L. Host–pathogen interactions in bacterial meningitis. **Acta Neuropathol**, v. 131, p. 185-209, 2016.

ERZURUMLUOGLU AM, 2014. Population and family based studies of consanguinity: Genetic and Computational approaches. **PhD thesis. University of Bristol**.
DISPONÍVEL EM: <https://mesuturkey.wordpress.com/2014/04/09/primer-designing-for-pcr/>. ACESSO EM: 26/01/2018.

FUKASAWA LO, SALGADO MM, GONÇALVES MG, CUSTÓDIO AV, ARAÚJO TP, CARVALHANAS TRMP, ALBERNAZ RKM, REIS JDP, COSTA MIWA, SACCHI CT. Use of cerebrospinal fluid and serum samples impregnated on FTATM Elute filter paper for the diagnosis of infections caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. **Pan-American Health Organization**, Washington DC, United States of America, 2017.

GANDHIA A, BALMERB P, YORK LJ. Characteristics of a new meningococcal serogroup B vaccine, bivalent rLP2086 (MenB-FHbp; Trumenba). **Postgrad Med**, v. 128, p 548–556, 2016.

GETTING STARTED GUIDE. Primer Express Software Version 3.0. **Applied Biosystems**. 2004.

GORDON SM, SRINIVASAN L, HARRIS MC. Neonatal Meningitis: Overcoming Challenges in Diagnosis, Prognosis, and Treatment with Omics. **Front Pediatr**, v.5, ap.139, 2017.

GUARNER J, LIU I, BHATNAGAR J, JONES T, PATEL M, CARNES MDL, ZAKI SR. Neutrophilic bacterial meningitis: pathology and etiologic diagnosis of fatal cases. **ModPathol**. v.26, p. 1076–1085, 2013.

HIGA FT, FUKASAWA LO, GONÇALVES MG, SALGADO MM, DE LEMOS APS, HARRISON LH, DE OLIVEIRA PL, DA SILVA CN, SACCHI CT. Use of sodC versus ctrA for real-time polymerase chain reaction-based detection of *Neisseria meningitidis* in sterile body fluids. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 246–247, 2013

HILL DJ, GRIFFITHS NJ, BORODINA E, VIRJI M. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. **Clin Sci (Lond)**, v.118, p. 547-64, 2010.

KHATER WS, ELABD SH. Identification of Common Bacterial Pathogens Causing Meningitis in Culture-Negative Cerebrospinal Fluid Samples Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Int J Microbiol**, v. 2016. June, 2016.

KLIEGMAN R, RICHARD EB, JENSON HB. **Nelson Tratado de Pediatria**. 20. ed, vol. 1, Seção 5, capítulo 192, 2017.

KLOEK AT, SETTEN JV, ENDE AVD, BOTS ML, ASSELBERGS FW, SERON MV, BROUWER MC, DE BEEK DV, FERWEDA B. Exome Array Analysis of Susceptibility to Pneumococcal Meningitis. **Sci Rep**, v. 6, p. 29351, 2016.

LADEIRA PRS, ISSAC C, FERREIRA MC. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Rev. Med. São Paulo**, v. 90, p. 47-51, 2011.

LEITE AA, HONÓRIO SR, TORRES GR, ERRANTE PR. Análise do líquido cefalorraquidiano. **Atas de Ciências da Saúde**, São Paulo, v.4, p.1-24, 2016.

YOUNG FN. **Remix of DNA replication.** DISPONÍVEL EM: <https://www.thinglink.com/scene/839614410950443009>. ACESSO EM 26/01/2018.

MARTÍNEZ-GIRON R, PANTANOWITZ L. Cerebrospinal fluid cytology in nonmalignant aseptic meningeal disorders. **Diagn Cytopathol**, v.45, p. 1020-1029, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DISPÓNIVEL EM: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/659-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/meningites/11337-informacoes-tecnicas>. ACESSO EM: 23/11/2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DISPÓNIVEL EM: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/659-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/meningites/11341-tratamento>. ACESSO EM: 08/01/2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília, 1 ed., 814 p., 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**. GUIA DE BOLSO. 8 EDIÇÃO. BRASÍLIA, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Vigilância em Saúde**. 7 ed., 813 p. 2009.

MORAES JC, KEMP B, DE LEMOS, APS, GORLA MCG, MARQUES EGL, FERREIRA MC, SACCHI C, CARVALHANAS TRMP, RIBEIRO AF, FERREIRA CM, SALGADO MM, FUKASAWA L, GONÇALVES MG, HIGA F, ANGERAMI R, FREITAS

AR, SATO HK, SÁFADI MAP. Prevalence, Risk Factors and Molecular Characteristics of Meningococcal Carriage Among Brazilian Adolescents. **Pediatric Infect Dis J**, v. 34, p. 1197-1202, 2015.

PEREIRA FL, JÚNIOR CAO, SILVA ROS, DORELLA FA, CARVALHO AF, ALMEIDA GMF, LEAL CAG, LOBATO FCF, FIGUEIREDO HCP. Complete genome sequence of *Peptoclostridium difficile* strain Z31. **Gut Patohog**. Department of Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary, Federal University of Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, Brazil. 2016.

TINSLEY CR, NASSIF X. Analysis of the genetic differences between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: Two closely related bacteria expressing two different pathogenicities. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 11109-11114, 1996.

SALGADO MM, GONÇALVES MG, FUKASAWA LO, HIGA FT, PAULINO JT, SACCHI CT. Evolution of bacterial meningitis diagnosis in São Paulo State-Brazil and future challenges. **Arq. Neuro-psiquiatr.**, v.71, n. 9, p. 672-6, 2013.

SCHOEN C, KISCHKIES L, ELIAS J, AMPATTU BJ. Metabolism and virulence in *Neisseria meningitidis*. **Cell Infect Microbiol**. Article 114, v. 4, p. 114, 2014.

SUTER TACS, DELOUGHERY JZ, JAWORSKI A. Meninges-derived cues control axon guidance. **Developmental Biology**, v.1, n. 430, p. 1-10, 2017.

VAN DE BEEK D, DE GANS J, TUNKEL AR, WIJDICKS EF. Community-acquired bacterial meningitis in adults. **N Engl J Med**, v. 354, p.44-53, 2006

VUONG J, COLLARD JM, WHALEY MJ, BASSIRA I, SEIDOU I, DIARRA S, OUÉDRAOGO RT, KAMBIRÉ D, TAYOR TH, SACCHI C, MAYER LW, WAND X. Development of Real-Time PCR Methods for the Detection of Bacterial Meningitis Pathogens without DNA Extraction. **PLoS One**, v.11, p. e0147765, 2016.

WELLER RO, SHARP MM, CRISTODOULIDES M, CARARE RO, MOLLGARD K. The meninges as barriers and facilitators for the movement of fluid, cells and pathogens related to the rodent and human CNS. **Acta Neuropathol**, v.135, p. 363-385, 2018.

WHO MANUAL. Manual de publicação da Organização Mundial de saúde: **Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae**. 2 ed, 323 p., 2011.

WHO, World Health Organization. **Meningococcal meningitis**. DISPONÍVEL EM: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/en/>. ACESSO EM: 18/01/2018.

WU HM, CORDEIRO SM, HARCOURT BH, DA CARVALHO MGS, AZEVEDO TQO, LEITE MC, SALGADO K, REIS MG, PLIKAYTIS BR, CLARK TA, MAYER LW, KO AI, MARTIN SW, REIS JN. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis. **BMC Infect. Dis.**, v.13, p. 26, 2013.

ZHU H, WANG Q, WEN L, XU J, SHAO Z, CHEN M, REVES PR, CAO B, WANG L. Development of a Multiplex PCR Assay for Detection and Genogrouping of *Neisseria meningitidis*. **J of Clin Microbiol**, v. 50, p. 46-51, 2011.