

DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DA MENINGITE VÍRICA*

estudo de 142 casos

J. AGUIAR NOGUEIRA, J. SIMÕES, N. PONTINHA, A. PINTO, A. FREITAS-FONSECA, H. LECOUR
Serviço de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina do Porto e do Hospital de S. João.
Serviço de Microbiologia da Faculdade de Medicina do Porto. Unidade de Microbiologia do IPATIMUP. Porto.

RESUMO

A meningite vírica é uma patologia comum, habitualmente benigna e que atinge mais frequentemente as crianças. Em 1997, ano em que se registou no norte do País um surto de meningite vírica, foi responsável por 496 internamentos no Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital de S. João. O objectivo dos autores foi determinar a etiologia dos casos de meningite vírica internados no H. S. João através, numa fase inicial, da pesquisa de enterovírus e da serologia da parotidite epidémica. Foram estudados 142 doentes que apresentavam manifestações clínicas e alterações citoquímicas do líquido cefalo-raquidiano (LCR) sugestivas de meningite vírica, na ausência de isolamento de qualquer agente bacteriano ou fúngico (no sangue e/ou LCR) e com pesquisa de antigénios capsulares livres no LCR negativa. A detecção de enterovírus no LCR foi feita pela técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR) e, num pequeno número de casos, por cultura celular em *shell vial*. O diagnóstico de parotidite epidémica baseou-se na detecção de anticorpos séricos da classe IgM, recorrendo a uma técnica imunoenzimática. Foi obtido diagnóstico etiológico em 70 doentes (49,3%): 47 (33,1%) apresentavam meningite por vírus da parotidite epidémica e 23 (16,2%) por enterovírus (PCR positivo em todos, com cultura positiva em apenas 2 casos). Em 72 doentes (50,7%) não foi identificado o agente. Salienta-se a alta percentagem de casos em que foi possível determinar a etiologia, pesquisando apenas dois agentes, bem como a baixa sensibilidade do método cultural utilizado no isolamento de enterovírus.

SUMMARY

Etiological diagnosis of viral meningitis – A study of 142 cases

Viral meningitis is a common disease, most often benign and striking predominantly children. In 1997, there was an outbreak of viral meningitis in the North of Portugal and this pathology accounted for 496 admissions to the Infectious Diseases Department of S. João Hospital. The authors' aim was to determine the etiology of the cases of viral meningitis admitted to the S. João Hospital by, in a first phase, searching enterovirus and serology for mumps in a sample of 142 patients with symptoms, signs and cerebrospinal fluid (CSF) cytochemical abnormalities typical of viral meningitis, in the absence of any bacterial or fungal growth (in blood and/or CSF) and with negative soluble bacterial antigens in CSF. The enterovirus was detected by polymerase chain reaction (PCR) and, in a small number of cases, by shell vial culture. The diagnosis of mumps was made by the detection of specific IgM antibodies in serum, using an enzyme-linked immunosorbent assay. The diagnosis was reached in 70 patients (49,3%): 47 (33,1%) had mumps meningitis and 23 (16,2%) enterovirus infection (PCR positive in all; culture positive in only 2 cases). In 72 patients (50,7%), the agent was not identified. Although only two agents were searched for, the diagnosis was made in a high proportion of cases. The culture method used for the isolation of enterovirus was found to have a low sensitivity.

* Trabalho subsidiado pelo Projecto PRAXIS/PSAN/SAV/14/96 e pelo Projecto de Investigação do Ministério da Saúde n° 69/97

INTRODUÇÃO

A meningite vírica é uma causa frequente de internamento hospitalar. Habitualmente benigna e auto-limitada, atinge com mais frequência as crianças. De acordo com diversos estudos efectuados, os enterovírus constituem uma causa importante de meningite asséptica, de predomínio no Verão e no Outono em climas temperados, e ocorrendo ao longo de todo o ano em áreas tropicais e subtropicais. Segundo Rotbart *et al.* os enterovírus são responsáveis por mais de 85% das meningites víricas nos Estados Unidos¹. O vírus da parotidite epidémica (VPE) é também um agente comum de meningite asséptica e de encefalite, que podem ocorrer mesmo sem evidência clínica de atingimento parotídeo; a sua epidemiologia foi, no entanto, alterada pela vacinação.

Embora seja agora raro como agente etiológico de infecção do sistema nervoso central, um dos primeiros vírus a ser associado a meningite asséptica humana foi o vírus da coriomeningite linfocitária². Também a infecção por qualquer vírus da família *Herpesviridae* (Herpes simplex tipos 1 e 2, varicela-zoster, citomegálico, Epstein-Barr, vírus herpes humano tipos 6 e 7) pode cursar com complicações neurológicas, muito embora sejam os vírus Herpes simplex os mais temíveis, já que além de serem agentes de meningite asséptica benigna, podem ocasionar encefalite herpética, uma patologia grave e potencialmente fatal.

Em 1997, ano em que ocorreu um surto de meningite vírica no norte de Portugal, que afectou mais de um milhão de casos, esta patologia foi responsável por 496 internamentos no Serviço de Doenças Infecciosas (SDI) do Hospital de S. João (HSJ) - Fig. 1. Como o diagnóstico etiológico da meningite vírica não é actualmente efectuado por rotina no HSJ, nas situações de dúvida é instituída frequentemente antibioterapia e/ou terapêutica antivírica com aciclovir, com consequente prolongamento do internamento e maiores custos de hospitalização.

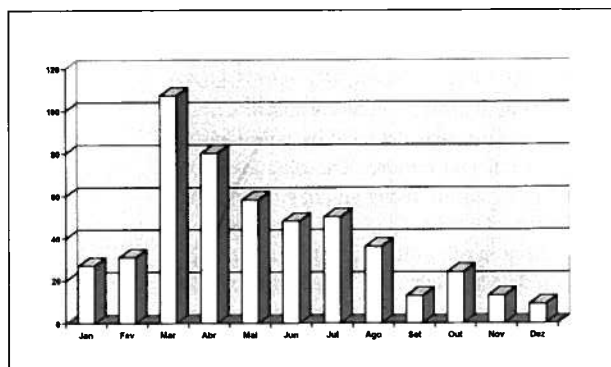


Fig. 1 - Distribuição mensal dos casos de meningite vírica internados no Serviço de Doenças Infecciosas do H.S. João durante o ano de 1997.

O objectivo do presente estudo foi determinar a etiologia dos casos de meningite vírica internados no SDI do HSJ, através da pesquisa, numa primeira fase, de enterovírus e da serologia da parotidite.

DOENTES, MATERIAL E MÉTODOS

Procedeu-se à recolha de amostras de líquido cefaloraquidiano (LCR) e de sangue obtidas no decurso do estudo analítico de 142 doentes internados no SDI do HSJ entre os meses de Julho de 1997 e Junho de 1998, escolhidos aleatoriamente entre o total de doentes com o diagnóstico de meningite vírica ou asséptica internados no mesmo período; 95 eram do sexo masculino (66,9%) e 47 do sexo feminino (33,1%), sendo as suas idades compreendidas entre 3 meses e 29 anos (média \pm desvio padrão: 5,2 \pm 4,3 anos).

O diagnóstico de meningite vírica ou asséptica foi baseado na presença de sintomas e sinais de irritação meníngea (febre, cefaleias e rigidez da nuca), pleocitose do LCR (>5 leucócitos/mm³), bioquímica do LCR normal ou com alterações mínimas, exame directo de LCR negativo, culturas de LCR negativas para bactérias e fungos, hemoculturas negativas e ausência de antígenos capsulares bacterianos livres (pesquisados por *Slidex méningite - Kit 5*[®], bioMérieux).

O LCR foi dividido em várias amostras e imediatamente congelado a -70°C. O soro foi separado e congelado a -20°C.

Procedeu-se à detecção de sequências genómicas de enterovírus pela técnica da reacção em cadeia da polimerase³ (PCR) (*Amplicor enterovirus*[®] - Roche Diagnostic Systems), utilizando *primers* que definem uma sequência de aproximadamente 150 nucleotídeos dentro de uma região altamente conservada com 750 nucleotídeos da extremidade 5' do genoma enterovírico², de acordo com as instruções do fabricante. Num pequeno número de amostras, efectuou-se cultura de enterovírus em *shell vial*, utilizando duas linhas celulares por amostra - células de rim de macaco (BGM) e rabiomiossarcoma (RD) - (ATCC - Vircell SL), sendo a identificação feita ao fim de 72 horas de incubação por imunofluorescência indirecta, recorrendo a um anticorpo anti-peptídeo VP1 (comum a todos os enterovírus)⁴.

A parotidite epidémica foi pesquisada através da detecção de anticorpos da classe IgM numa única amostra de soro, utilizando uma técnica imuno-enzimática (*Mumps IgM*[®] - Alphadia SA)^{5,6}.

Foram calculados os intervalos de confiança a 95% para as prevalências dos diagnósticos encontrados. As

proporções foram comparadas pela prova de qui-quadrado. A distribuição dos agentes por trimestre foi estudada usando a prova *chi-square goodness-of-fit test*.

RESULTADOS

Foi obtido o diagnóstico etiológico em 70 doentes (49,3%) - Quadro I. A maioria dos síndromes meníngeas em que se obteve diagnóstico foi devida ao VPE (47 doentes, correspondendo a 33,1%); os enterovírus foram responsáveis por 23 casos (16,2%). Em 72 doentes (50,7%) não foi possível apurar a etiologia.

Quadro I - Etiologia dos casos de meningite vírica estudados

Etiologia	n (%)	IC %
Enterovírus	23 (16,2)	10,8 - 23,0
Vírus da parotidite epidémica	47 (33,1)	25,7 - 41,1
Outra (não identificada)	72 (50,7)	42,5 - 53,9

IC: Intervalo de confiança a 95%

A cultura de enterovírus em *shell vial* foi efectuada em 20 doentes (Quadro II), com sensibilidade de 22,2% e especificidade de 100% relativamente à determinação por PCR.

Quadro II - Identificação de enterovírus por PCR e cultura em *shell vial*

PCR	Nº de amostras submetidas a cultura		Total
	Positiva	Negativa	
Positivo	2	7	9
Negativo	0	11	11
Total	2	18	20

A meningite por VPE revelou predomínio nos meses de Julho a Setembro, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas na distribuição trimestral dos casos estudados de meningite por enterovírus (Quadro III), nem na distribuição dos agentes etiológicos por sexo e classes de idade (Quadro IV).

Quadro III - Distribuição dos agentes etiológicos por trimestre (Julho/97 a Junho/98)

Meses	Enterovírus* n (%)	VPE** n (%)	Etiologia não definida*** n (%)
Jul-Set	8 (34,8)	30 (63,8)	22 (30,6)
Out-Dez	5 (21,7)	8 (17,0)	16 (22,2)
Jan-Mar	8 (34,8)	6 (12,8)	13 (18,0)
Abr-Jun	2 (8,7)	3 (6,4)	21 (29,2)
Total	23 (100)	47 (100)	72 (100)

VPE: Vírus da parotidite epidémica

* $\chi^2=4,3$; $p=0,230$

** $\chi^2=38,9$; $p<0,0005$

*** $\chi^2=3,0$; $p=0,392$

Quadro IV - Distribuição dos agentes etiológicos por classes de idade e sexo

	Agentes etiológicos			p
	Enterovírus n (%)	VPE n (%)	Não definido n (%)	
Idade (anos)*				
0-1	2 (10,5)	3 (15,8)	14 (73,7)	0,229
2-3	4 (15,4)	8 (30,8)	14 (53,8)	
4-5	4 (11,1)	15 (41,7)	17 (47,2)	
≥ 6	11 (25,0)	14 (31,8)	19 (43,2)	
Sexo				
Masculino	17 (17,9)	28 (29,5)	50 (52,6)	0,394
Feminino	6 (12,8)	19 (40,4)	22 (46,8)	

* Não foi possível apurar a idade em 17 crianças

DISCUSSÃO

O diagnóstico etiológico da meningite por enterovírus não é muitas vezes efectuado, entre outros factores, pela inexistência de métodos rápidos e simples para a detecção de antigénios ou de anticorpos específicos, dada a diversidade serotípica que estes agentes apresentam. Por outro lado, a cultura vírica é demorada (em média 6 ou 7 dias até à identificação do crescimento, sendo necessárias duas a três semanas para ser dada como negativa) e tem uma sensibilidade baixa (65 a 75%)². Acresce o facto de não ser possível a detecção de 25 a 35% dos serótipos, especialmente de Coxsackie A, que não são cultiváveis⁷. A utilização de métodos de amplificação genética pode permitir superar estas dificuldades, uma vez que teoricamente apresentam maior sensibilidade, são específicos e podem ser efectuados num período mais curto (6 a 7 horas), fornecendo resultados em tempo útil para a definição da terapêutica.

Os resultados obtidos neste estudo permitem confirmar a maior sensibilidade do PCR em relação à cultura vírica, assim como uma maior rapidez na obtenção de resultados - 6 a 7 horas *versus* 72 horas, pelo menos. A baixa sensibilidade da cultura em *shell vial*, motivo pelo qual foi abandonada no decurso do trabalho, pode ser explicada pela conhecida dificuldade ou impossibilidade de cultivar determinados serótipos de enterovírus, por uma rápida perda de infecciosidade, que torna negativas amostras colhidas mais de 24 horas após o início dos sintomas e pela presença de anticorpos neutralizantes. Nenhum destes factores afecta o PCR⁸. O método comercial utilizado revelou-se de execução simples e relativamente rápido, permitindo, quando utilizado por rotina nos casos de meningite cuja etiologia não é imediatamente evidente, definir juntamente com os dados clínicos uma terapêutica apropriada e, conseqüentemente, evitar o uso de antimicrobianos e/ou aciclovir e o prolongamento da hospitalização.

Observaram-se casos de meningite por enterovírus durante todo o ano, não tendo a distribuição trimestral revelado diferenças estatisticamente significativas (Quadro III).

O estudo iniciou-se ainda durante a fase final do surto de parotidite epidémica que ocorreu em Portugal em 1996 e 1997, causado por uma estirpe não coberta pela vacina disponível no Programa Nacional de Vacinação⁹, o que poderá ter contribuído para o elevado número de meningites por este agente. A grande maioria dos casos foi, assim, observada entre os meses de Julho e Setembro de 1997, em contraste com a curva epidemiológica habitual da parotidite epidémica, mais frequente no Inverno¹⁰.

Em cerca de metade dos doentes estudados não foi possível determinar a etiologia da meningite. Para tal objectivo será necessário alargar a pesquisa a outros agentes, nomeadamente a vírus do grupo Herpes e ao vírus da coriomeningite linfocítica.

CONCLUSÕES

Na casuística estudada e no período considerado, verificou-se um predomínio de casos de meningite por VPE relativamente à infecção por enterovírus. Salienta-se o facto de a infecção do sistema nervoso central por VPE poder ser, em geral, prevenida através da imunização, o que reforça a necessidade de cumprir escrupulosamente o Programa Nacional de Vacinação e de manter a vigilância epidemiológica com o objectivo de detectar estirpes não cobertas pela vacina em uso, facto que pode também implicar a substituição da estirpe vacinal.

A utilização por rotina de um teste rápido, sensível e específico para a detecção de enterovírus terá também um efeito notório no tratamento da meningite vírica, evitando hospitalizações prolongadas e utilização desnecessária de antibióticos ou antivíricos. A cultura em *shell vial* é desnecessária, em virtude da maior sensibilidade e rapidez das técnicas de biologia molecular.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração de Margarida Tavares (C. H. Vila Nova de Gaia) no tratamento estatístico dos dados, e de Estrela Oliveira, Isabel Costa e Ana Carvalho (Departamento de Patologia Clínica do Hospital de S. João).

BIBLIOGRAFIA

1. ROTBART HA, SAWYER MH, FAST S, LEWINSKI C, MURPHY N, KEYSER EF, et al: Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J Clin Microb* 1994;32:2590-2
2. CONNOLLY KJ, HAMMER SM: The acute aseptic meningitis syndrome. *Infect Dis Clin North Am* 1990;4:599-622
3. LINA B, POZZETTO B, ANDREOLETTI L, BEGUIER E, BOURLET T, DUSSAIX E, et al: Multicenter evaluation of a commercially available PCR assay for diagnosing enterovirus infection in a panel of cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microb* 1996;34:3002-6
4. KLESPIES SL, CEBULA DE, KELLEY CL, GALEHOUSE D, MAURER CC: Detection of enterovirus from clinical specimens by spin amplification shell vial culture and monoclonal antibody assay. *J Clin Microb* 1996;34:1465-7
5. GUT JP, SPIESS C, SCHMITT S, KIRN A: Rapid diagnosis of acute mumps infection by a direct immunoglobulin M antibody capture enzyme immunoassay with labeled antigen. *J Clin Microb* 1985;21:346-52
6. HARMSEN T, JONGERIUS MC, ZWAN CW, PLANTINGA AD, KRAAIJEVELD CA, BERBERS GA: Comparison of a neutralization enzyme immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of immune status of children vaccinated for mumps. *J Clin Microb* 1992;30:2139-44
7. ROTBART HA: Nucleic acid detection systems for enteroviruses. *Clin Microb Rev* 1991;4:156-68
8. YERLY S, GERVAIX A, SIMONET V, CAFLISCH M, PERRIN L, WUNDERLI W: Rapid and sensitive detection of enteroviruses in specimens from patients with aseptic meningitis. *J Clin Microb* 1996;34:199-201
9. AFZAL MA, BUCHANAN J, DIAS JA, CORDEIRO M, BENTLEY ML, SHORROCK CA, et al: RT-PCR based diagnosis and molecular characterisation of mumps viruses derived from clinical specimens collected during the 1996 mumps outbreak in Portugal. *J Med Virol* 1997;52:349-53
10. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: Summary of notifiable diseases, United States, 1991. *MMWR* 1991;40:3