

Nova versão do ensaio da PCR em tempo real para o diagnóstico laboratorial e vigilância epidemiológica das meningites bacterianas

Improved Real Time PCR assay for diagnostic and epidemiological surveillance of bacterial meningitis

Maristela Marques Salgado¹, Fábio Takenori Higa¹, Maria Gisele Gonçalves¹, Lucila Okuyama Fukasawa¹, Bernadete Lourdes Liphaut¹, Priscilla Lima de Oliveira¹, Carla Naufal da Silva¹, Cláudio Tavares Sacchi¹

¹Centro de Imunologia. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

¹Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

A incorporação do ensaio “triplex” de PCR em tempo-real (PCR-TR) à vigilância das meningites bacterianas a partir de 2007 aumentou a detecção de *S. pneumoniae* em 52%, de *N. meningitidis* em 85% e de *H. influenzae* em 20%. Entretanto, a detecção do *H. influenzae* se limitou às cepas capsuladas de 4 sorotipos (“a”, “b”, “c”, “d”). Em 2011, um novo ensaio para detectar todos os sorotipos de *H. influenzae*, inclusive os *H. influenzae* não tipáveis, foi proposto, com a substituição do gene *bexA* pelo gene *hpd* no ensaio triplex (“triplex modificado”) responsável pela proteína D de *H. influenzae*. Foram analisadas 1619 amostras clínicas de líquido cefalorraquidiano e/ou sangue de pacientes com suspeita de meningite bacteriana do município de São Paulo no período de junho a dezembro de 2011, nos dois formatos de PCR-TR “triplex”. O novo ensaio “triplex modificado” (com o gene *hpd*) detectou 13 casos adicionais de *H. influenzae*, não registrados pelo outro formato (com o gene *bexA*). Destes 13 casos adicionais, 12 foram Hi-nt e um do sorotipo “f”. Não houve modificação na sensibilidade em detectar amostras positivas para *N. meningitidis* ou *S. pneumoniae*. O emprego deste novo formato “triplex modificado” irá aprimorar o diagnóstico e a vigilância epidemiológica das meningites bacterianas, contribuindo com a redução dos casos de meningite sem etiologia definida.

PALAVRAS-CHAVE: Meningite bacteriana. PCR em tempo real.
Haemophilus influenzae.

ABSTRACT

Incorporation of a triplex assay on Real-Time PCR (PCR-TR) to bacterial meningitis surveillance, started in 2007, increased the detection of *S. pneumoniae* in 52%, of *N. meningitidis* in 85% and *H. influenzae* in 20%. Nevertheless *H. influenzae* detection was limited to capsule strains of 4 serotypes (“a”, “b”, “c”, “d”). In 2011 a new assay, designed to detect all serotypes of *H. influenzae*, including non typed *H. influenzae*, was proposed, with the replacement of the *bexA* gene by the *hpd* gene in the triplex assay (“modified triplex”), responsible by the D protein of *H. influenzae*. The analysis was performed in 1619 clinical samples of cerebrospinal fluid and/or blood from patients suspicious of bacterial meningitis in the city of São Paulo, during the period comprised between June and December, 2011, in both PCR-RT “triplex” formats. The new “modified triplex” format assay (with the *hpd* gene) detected 13 more cases than the previous format (with the *bexA* gene). Of these 13 additional cases, 12 were Hi-nt and one of the “f” serotype. There was no change in the sensitivity to detect positive samples for *N. meningitidis* or *S. pneumoniae*. Adoption of the new “triplex modified” format will improve diagnosis and epidemiologic surveillance of bacterial meningitis, contributing to the reduction of meningitis cases with undefined etiology.

KEY WORDS: Bacterial meningitis. Real time PCR. *Haemophilus influenzae*.

As meningites bacterianas são importante desafio à saúde pública por sua expressiva morbidade e mortalidade.^{1,2} Três bactérias são responsáveis por cerca de 90% dos casos de meningites, a *Neisseria meningitidis*, o *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) e o *Streptococcus pneumoniae*.^{1,2} Identificar corretamente os agentes responsáveis pelas meningites é importante devido aos recentes avanços vacinais contra estas infecções.^{3,4}

O *H. influenzae* pode ser não tipável (Hi-nt), ou ser classificado em seis sorotipos “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f”, de acordo com as diferenças antigênicas de sua cápsula polissacarídica. O Hib

pode causar além da meningite, epiglotite, pneumonia, celulite, artrite séptica, osteomielite e pericardite, embora cepas de outros sorotipos ou ainda não tipáveis também possam causar doença invasiva.^{1,2}

A introdução da vacina conjugada contra o Hib no calendário vacinal em 1999 proporcionou importante redução dos casos invasivos causados por este agente no Brasil e em vários outros países.^{5,1,3} No estado de São Paulo, nos últimos anos, a taxa de incidência de meningite por Hib em menores de 5 anos de idade declinou de 11,9/100.000 para aproximadamente 0,5/100.000

habitantes, após a introdução da vacina no calendário vacinal oficial do Estado, observando-se uma redução de mais de 90% dos casos.^{6,2} Após a introdução desta vacina em nosso país, a média anual caiu de 305 para 96 isolados de *H. influenzae* recebidos pelo Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Referência Nacional (LRN) para meningites bacterianas.^{7,2}

Entre as cepas de *H. influenzae* isoladas de líquido cefaloraquidiano (LCR) ou sangue de casos de meningite bacteriana que foram recebidos pelo LRN para sorotipagem, o Hib representou 98% das amostras isoladas no período pré-vacinal (1990 a 1999) versus 59% no período pós-vacinal (2000 a 2008).⁷ No entanto, no período pós-vacinal o isolamento de cepas de *H. influenzae* de outros sorotipos aumentou de 1% para 19%.^{2,7} Além disso, o isolamento de cepas de Hi-nt aumentou de 2% para 22%.^{2,7} A incidência de casos de meningite por *H. influenzae* no estado de São Paulo permaneceu abaixo de 1 caso por milhão de habitantes durante os anos de 2000 a 2008⁶. Estudo recente mostrou que a incidência anual estimada de casos de meningite por Hi-nt aumentou em todas as faixas etárias (média de 0,03 casos por 100.000 habitantes) no período pós-vacinal.⁷

Em 2007, o LRN implementou e validou um ensaio “triplex” de PCR em tempo-real (PCR-TR) para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas causadas por *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*.⁸ Este ensaio desenvolvido no LRN é composto por três pares de iniciadores e suas sondas, cujos alvos genéticos são: (I), o gene *ctrA*, responsável pelo transporte da cápsula de *N. meningitidis*;⁹ (II), o gene *lytA*, responsável pela produção de autolisina de *S. pneumoniae*;¹⁰ e (III), o gene *bexA*, responsável pela expressão capsular de *H. influenzae*.¹¹

A sensibilidade deste ensaio em LCR foi de 100% (95% intervalo de confiança, 96,0% a 100%) para *N. meningitidis*; 97,8% (88,5% a 99,9%) para *S. pneumoniae* e 66,7% (9,4% a 99,2%) para *H. influenzae*. A especificidade para estes três organismos variou de 98,9% a 100%. Já nas amostras de soro, as sensibilidades foram menores (57,1%; 80% e 0%, respectivamente) e as especificidades variaram entre 94,1% a 100%.⁸ Os valores preditivos positivo e negativo em LCR variaram de 98,3% a 100% e 98,9% a 100%, respectivamente.⁸

A adição deste ensaio na rotina diagnóstica das meningites bacterianas aumentou a detecção de casos de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* e *H. influenzae* em 52%, 85% e 20%, respectivamente, em relação à cultura.⁸ Entretanto, a baixa frequência de casos por *H. influenzae*, devido à queda de doença invasiva por Hib após a incorporação da vacina conjugada no Programa Nacional de Imunização, limitou o estudo referente ao desempenho do componente *H. influenzae* em nosso ensaio. O fato do gene alvo utilizado (*bexA*) detectar somente *H. influenzae* dos sorotipos “a”, “b”, “c”, e “d”, mas não os sorotipos “e”, “f”, e nem cepas Hi-nt, certamente contribuiu para limitar nossas análises.

Em 2011, novo ensaio para detectar casos por *H. influenzae* pertencentes a qualquer um dos seis sorotipos e inclusive os Hi-nt, foi proposto tendo o gene *hpd*, responsável pela proteína D de *H. influenzae*, como gene alvo. A substituição do gene alvo *bexA* pelo *hpd* resultou em um ensaio com maior sensibilidade.^{12,13}

Com a expectativa de aumentar a capacidade da PCR-TR em detectar casos de meningites bacterianas causadas por *H. influenzae*, o IAL avaliou a substituição do gene *bexA* de nosso ensaio 'triplex' pelo gene *hpd*

(“triplex” modificado). Nossos resultados demonstraram que o limite mínimo de detecção do “triplex modificado” para os genes alvos de *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* foi de 200 fg de DNA, o mesmo obtido pelo ensaio “triplex”. Ambos os ensaios “triplex” e “triplex modificado” foram utilizados em paralelo em 1619 amostras clínicas de LCR e/ou sangue de pacientes do município de São Paulo no período de julho a dezembro de 2011. O novo ensaio “triplex modificado” detectou 13 casos de *H. influenzae* que não haviam sido detectados pelo ensaio “triplex”. Destes 13 casos adicionais detectados, 12 foram Hi-nt e um foi do sorotipo “F”. Não houve modificação na

sensibilidade em detectar amostras positivas para *N. meningitidis* ou *S. pneumoniae*.

Considerando o aumento do número de casos de meningites bacterianas por *H. influenzae* não Hib e Hi-nt no Brasil⁷ e a limitação de nosso ensaio “triplex” em detectar cepas de *H. influenzae* dos sorotipos “e”, “f” e Hi-nt, houve a necessidade de reformulação do componente para *H. influenzae* no ensaio “triplex” da PCR-TR onde o alvo genético *bexA* foi substituído pelo gene *hpd*. Deste modo o LRN recomenda o uso deste novo ensaio “triplex modificado” no diagnóstico etiológico e na vigilância epidemiológica das meningites bacterianas no sentido de monitorar a emergência de novos sorotipos de *Haemophilus* circulantes.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Meningite. In: Guia de vigilância epidemiológica. 6ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005, p.541-69.
2. Carvalhanas TRMP, Brandileone MCC, Zanella RC. Meningites bacterianas. Bol Epidemiol Paulista (BEPA) 2005; 2(17): 1-13.
3. Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, Plikaytis BD, Zell ER, Broome CV, et al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. JAMA. 1993; 269(2): 221-6.
4. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Comissão Permanente de Assessoramento em Imunizações. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Suplemento da norma técnica do Programa de Imunização: introdução de novas vacinas no calendário estadual de imunização. São Paulo: SES/SP, 2011.
5. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de informação de agravos e notificação – SINANnet: tabulação de dados (TABNET). Acesso em: xxxxx. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>.
6. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre

- Vranjac”. Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória. Dados estatísticos. Acesso em: xxxx Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov/htm/resp/meni_dados.html.
7. Zanella RC, Bokermann S, Andrade ALSS, Flannery B, Brandileone MCC. Changes in serotype distribution of *Haemophilus influenzae* meningitis isolates identified through laboratory-based surveillance following routine childhood vaccination against *H. influenzae* type b in Brazil. *Vaccine*. 2011;29(48):8937-42.
 8. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, et al. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011;6(6):e 20675.
 9. Mothershed EA, Sacchi CT, Whitney AM, Barnett GA, Ajello GW, Schmink S, et al. Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1): 320-8.
 10. Carvalho MD, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR detection assays to *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2460-6.
 11. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Fox AJ, et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39(4): 1553-8.
 12. Wang X, Maira R, Hatcher C, Theodora MJ, Edmond K, Wua HM, et al. Detection of bacterial pathogens in Mongolia meningitis surveillance with a new real-time PCR assay to detect *Haemophilus influenzae*. *Int J Med Microbiol*. 2011;301(4):303-9.
 13. Wang X, Theodore MJ, Mair R, Trujillo-Lopez E, du Plessis M, Wolter N, et al. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):702-8.

Correspondência/Correspondence to:
Maristela Marques Salgado
Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar
CEP: 01246-902 – São Paulo/SP – Brasil
Tel.: 55 11 3068-2899
E-mail: rede.pcr@gmail.com