

Avaliação da PCR-TR na detecção de *Haemophilus influenzae* em amostras de secreção de nasofaringe de crianças saudáveis

Cinthya Terumi Ogassavara; Rosemeire Cobo Zanella Ramos (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo – Brasil, 2013

RESUMO

Haemophilus influenzae (Hi) é um microrganismo que faz parte da microbiota transitória da nasofaringe humana e, eventualmente, pode causar doenças em indivíduos suscetíveis. A vacina Hib conjugada além de proporcionar uma proteção direta contra a doença nos vacinados, também reduz a colonização da nasofaringe pelas cepas vacinais. Os estudos de portador de Hi na população permitem a caracterização das cepas circulantes, portanto a identificação correta do microrganismo é de fundamental importância para estimar com acurácia o efeito da vacina. A técnica padrão-ouro para detectar Hi em material clínico é a cultura, um método específico, de sensibilidade variável e que demanda maior tempo para a completa identificação do microrganismo. O uso de técnicas moleculares tem auxiliado na diferenciação de Hi de outras espécies do gênero *Haemophilus*, devido à alta sensibilidade e especificidade para detectar o agente etiológico. Diferentes ensaios de PCR-TR e PCR foram desenvolvidos para o diagnóstico de Hi utilizando diferentes genes alvo específicos como o gene *hpd* e o gene *fucK*. Estes genes são altamente conservados e permite a detecção de Hi capsulado e não capsulado. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a acurácia da PCR-TR utilizando o marcador molecular *hpd#3* para detectar o Hi na secreção de nasofaringe de crianças saudáveis comparando-a com a cultura. Um total de 410 amostras de secreção de nasofaringe estocadas a -70°C em meio STGG foi selecionado aleatoriamente para esta avaliação. Pela PCR-TR, 161 (39,2%) amostras foram positivas para o gene *hpd* e 249 (60,8%) negativas. Pela cultura, 166 (40,5%) amostras foram positivas para Hi e 244 (59,5%) culturas negativas. Sendo assim, a PCR-TR apresentou uma sensibilidade de 90,9% (95% IC: 85,3-94,7) e especificidade de 95,9% (95% IC: 92,4-97,9) quando comparada à cultura para detectar Hi. A análise dos resultados não detectou diferença significativa (qui-quadrado de McNemar = 0,64 $p > 0,5$) entre a PCR-TR e a cultura, e o índice Kappa revelou uma excelente concordância (0,873) entre as técnicas. Como complementação de resultado, as mesmas amostras foram avaliadas pela PCR convencional para a presença do gene *fucK* e somente 99 (24%) amostras foram positivas e 311 (76%) negativas para a presença deste gene. Sendo assim, a PCR convencional apresentou uma sensibilidade de 57,8% (95% IC: 49,9-65,4) e uma especificidade de 98,8% (95% IC: 96,2-99,7), comparada à cultura. Uma menor positividade foi obtida pela PCR quando comparada à cultura (qui-quadrado de McNemar = 0,64 $p < 0,05$) e o índice Kappa revelou uma moderada concordância (0,605) entre as técnicas. De acordo com a excelente concordância de resultados entre a PCR-TR (*hpd#3*) e a cultura, concluímos que esta técnica é uma ferramenta importante para detectar Hi em amostras de nasofaringe e pode ser utilizada em estudos de portador com base populacional para avaliação do efeito da vacina de Hi.

PALAVRAS-CHAVE: *Haemophilus influenzae*. Portador. Cultura bacteriana. PCR. *Hpd*. *FucK*.

Abstract

Evaluation of real-time PCR assay for *Haemophilus influenzae* detection in nasopharyngeal samples from healthy children

Cinthya Terumi Ogassavara; Rosemeire Cobo Zanella Ramos (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo – Brasil – 2013

ABSTRACT

Haemophilus influenzae (Hi) colonizes the human nasopharynx and eventually can cause diseases in susceptible individuals. The Hib conjugate vaccine provides direct protection against the diseases and also reduces nasopharyngeal colonization by vaccine strain. Hi carriage studies allow the knowledge of circulating strains and the accurate identification of the microorganism is important to estimate the effect of the vaccine. Culture is the gold standard method to detect Hi in clinical samples, this is a specific method, with variable sensitivity and demand more time for the complete identification of the microorganism. The use of molecular techniques has helped in differentiating Hi from other species of the *Haemophilus* spp. due to the high sensitivity and specificity to detect the etiologic agent. Different RT-PCR and PCR assays were developed for the diagnosis of Hi using several biomarker genes such as *hpd* and *fucK* gene. These genes are highly conserved and are present in encapsulated and non-encapsulated Hi strains, allowing the detection of both variants. The aim of this study was to evaluate the accuracy of RT-PCR to detect Hi in nasopharyngeal samples of healthy children vaccinated against Hib comparing it with the culture. A total of 410 nasopharyngeal swabs stored at -70°C in STGG medium were randomly selected to evaluate RT-PCR assay targeting protein D (*hpd*#3). Considering the 410 nasopharyngeal swabs, 161 (39.2%) samples were positive for Hi and 249 (60.8%) had negative RT-PCR. By culture, 166 (40.5%) samples were positive for Hi and 244 (59.5%) were negative. Thus, the *hpd*#3 RT-PCR showed a sensitivity of 90.9% (95% CI: 85.3 - 94.7) and a specificity of 95.9% (95% CI: 92.4 - 97.9) when compared to culture to detect Hi in nasopharyngeal swabs. The results showed no significant difference (McNemar's chi-square = 0.64 $p > 0.5$) between RT-PCR and culture and the Kappa coefficient showed an excellent agreement (0.873) between the two techniques. As complementary results, the same samples was evaluated for the presence of the *fucK* gene by conventional PCR and only 99 (24%) samples were positive and 311 (76%) were negative for the presence of this gene. Thus, the *fucK* PCR showed a sensitivity of 57.8% (95% CI: 49.9 - 65.4) and a specificity of 98.8% (95% CI: 96.2 - 99.7) when compared to culture. A lower positivity was obtained by PCR compared to culture (McNemar's chi-square = 0.64 $p < 0.05$) and the Kappa coefficient showed a moderate correlation (0.605) between the two techniques. According to the excellent agreement between the results of *hpd*#3 RT-PCR and culture, we have concluded that this technique is an important tool for detecting Hi in nasopharyngeal samples and can be used in studies of population-based carriage to assess the effect of the Hi vaccine.

KEYWORDS: *Haemophilus influenzae*. Carriage, Bacterial culture, PCR, *Hpd*, *FucK*.