

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 Liphau², 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

²Centro 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*(Hi) 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* (Hi) 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.

KEYWORDS: 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, epiglote, 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. 6^a 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
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: redes.pcr@gmail.com