

**Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz**  
*Introduction of conventional and real time PCR for laboratory diagnostic of bacterial meningitis at Instituto Adolfo Lutz*

Laboratório de Meningites Bacterianas, da Seção de Imunologia, do Instituto Adolfo Lutz – IAL, Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES-SP

### Introdução

As meningites bacterianas são um sério problema de saúde pública mundial. Estima-se que ocorram cerca de 170.000 mortes por ano no mundo, e entre 10% a 20% dos sobreviventes ainda adquiram seqüelas neurológicas irreversíveis ([http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/soa\\_bacterial/en/index2.html#introduction](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_bacterial/en/index2.html#introduction)). Os principais agentes causadores da doença são *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae b*, este em menor proporção desde a introdução da vacina conjugada, no segundo semestre de 1999.

No Estado de São Paulo, entre 2000 e 2006, foram notificados 74.449 casos de meningite, mas somente 24,7% deles tiveram sua etiologia determinada. Dentre esses, 8.710 casos (11,7%) foram diagnosticados como doença meningocócica, 3.497 (4,7%) como meningite pneumocócica e 489 (0,6%) como meningite causada por Hib. Outros 14.990 casos (20%) foram considerados como de possível causa bacteriana, porém sem identificação do agente etiológico ([http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/CVE\\_DAT.HTM](http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/CVE_DAT.HTM)).

É de extrema importância discriminar as meningites bacterianas, com a identificação do agente etiológico, pois permite: (I) o controle da doença pelas autoridades em saúde pública através de quimioprofilaxia e vacinação; (II) a introdução de terapia correta nos pacientes, uma vez que muitas cepas bacterianas, especialmente os pneumococos, apresentam resistência a múltiplos antibióticos; (III) o desenvolvimento de novas vacinas baseadas na distribuição epidemiológica das meningites, uma vez que a resposta imune é específica ao sorogrupo e/ou sorotipo da bactéria.

O diagnóstico laboratorial definitivo das meningites bacterianas exige o isolamento de bactérias por cultura do líquido cefalorraquidiano (LCR) e/ou sangue. Entretanto, em torno de 50% dos casos suspeitos de meningite bacteriana não são confirmados por esta técnica, devido a problemas relacionados com a semeadura e transporte inadequado da amostra clínica e/ou uso de antibióticos antes da coleta do material. Métodos microbiológicos tradicionais, como a coloração de Gram ou a aglutinação por látex, estão disponíveis para a detecção de alguns agentes, mas não são suficientemente sensíveis para detectar esses agentes quando em pequenas concentrações, como geralmente encontrados em amostras clínicas de pacientes submetidos à antibioticoterapia.

### Método da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico

A PCR, nos últimos anos, é amplamente aplicada em centenas de procedimentos laboratoriais e considerada como o método de escolha no diagnóstico e caracterização molecular de diversos agentes bacterianos. A principal vantagem desta metodologia em relação à cultura é a redução do tempo de obtenção de resultados e a detecção do microrganismo sem necessidade de um cultivo prévio. Além disso, a PCR apresenta maior sensibilidade e especificidade que a cultura, representando um método laboratorial rápido e seguro.

Duas versões do método da PCR são bem conhecidas e utilizadas em laboratórios de diagnóstico: a PCR convencional e a PCR em tempo real, uma modificação da técnica tradicional. A PCR em tempo real identifica o DNA alvo com maior sensibilidade, uma vez que a detecção da amplificação é feita através da captação de fluorescência. Esta técnica apresenta também maior especificidade devido à utilização de uma sonda específica para o fragmento alvo na reação. A amplificação e a detecção do DNA são realizadas simultaneamente em um sistema fechado, dispensando procedimentos adicionais como a corrida eletroforética dos produtos em gel de agarose e fotodocumentação. Com a eliminação destas etapas, os resultados são obtidos mais precocemente pela PCR em tempo real quando comparada à convencional.

A escolha do método dependerá de vários fatores como: equipamento disponível, demanda de exames, custo e pessoal técnico especializado. As duas versões da PCR diferem em vários aspectos, como sensibilidade, especificidade, limite mínimo de detecção e equipamentos requeridos, entre outros. As principais características comparativas destes dois métodos estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características dos métodos de PCR convencional e em tempo real padronizados no IAL.

Características	PCR convencional	PCR em tempo real
Equipamentos necessários	Três (termociclador; sistema de eletroforese: cuba+fonte de alimentação; sistema de fotodocumentação)	Um único equipamento (amplificação e detecção simultânea)
Especificidade	Menor especificidade em relação à PCR em tempo real	Maior especificidade em relação ao PCR convencional devido à presença de uma sonda
Sensibilidade <sup>1</sup>	Limite de detecção entre 2 a 20 pg/ reação	Limite de detecção em torno de 200 fg/ reação (10 a 100 x maior)
Sistema	Não-automatizado	Automatizado
Resultados	Não são expressos em números	São expressos em números
Interpretação dos resultados	Baseado na observação de banda em gel de agarose	Baseado em valores de Ct, determinados por um software
Quantificação do DNA	Não permite	Permite
Geração de resíduos tóxicos	Sim	Não
Tempo de execução	6 a 8 horas	2 a 3 horas
N. amostras por corrida	Depende da capacidade do termociclador	42 amostras em duplicata + controles
Custo	Menor em relação ao PCR em tempo real	Maior em relação ao PCR convencional
Limitações do método (proposto pelo IAL) <sup>1</sup>	Não detectam cepas não-capsuladas de Hi <sup>2</sup> ; podem detectar eventuais falsos positivos para Spn <sup>3</sup>	Não detectam cepas de Hi <sup>2</sup> dos sorotipos e/f e cepas não-capsuladas; podem detectar eventuais falsos positivos para Spn <sup>3</sup>

1. Dados do IAL

2. *Haemophilus influenzae*

3. *Streptococcus pneumoniae*

## Padronização da PCR convencional e em tempo real no IAL

O Instituto Adolfo Lutz (IAL) padronizou as metodologias de PCR convencional e em tempo real para a detecção, em amostras clínicas, dos três principais agentes causadores de meningites bacterianas (Men, Spn e Hi), baseados em trabalhos anteriormente publicados por Carvalho<sup>1</sup>, Corless<sup>2</sup>, Forbs<sup>3</sup>, Mothershed<sup>4</sup> e Taha<sup>5</sup>. Nestes métodos os ensaios foram padronizados no formato triplex para a detecção de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*.

### **Padronização da PCR convencional**

A metodologia de PCR convencional padronizada no IAL baseia-se na detecção simultânea de três genes: o *crgA*, envolvido no processo de adesão de *N. meningitidis* à mucosa de orofaringe humana; o *lytA*, responsável pela produção de autolisina em *S. pneumoniae*; e o *ompP2*, responsável por uma proteína de membrana externa em *H. influenzae*.

Algumas restrições para esta metodologia são:

- I) como as cepas de *H. aegyptius* também são portadoras do gene *ompP2*, a detecção deste gene poderia ser um resultado positivo para *H. influenzae* ou *H. aegyptius*, entretanto, o *H. aegyptius* é raramente encontrado no líquido, sendo mais freqüente no soro e apenas nos casos de febre purpúrica brasileira e
- II) como algumas cepas de *Streptococcus* do grupo viridans possuem o gene *lytA*, a detecção da presença deste poderia indicar um resultado positivo para *S. pneumoniae* ou para *Streptococcus* do grupo viridans, porém, cepas do grupo viridans com o gene *lytA* não foram, até o momento, isoladas de LCR e/ou soro em nossos laboratórios.

### **Padronização da PCR em tempo real**

A PCR em tempo real proposta pelo IAL baseia-se na detecção simultânea de três genes na mesma reação: o gene *ctrA*, que está envolvido no processo de transporte da cápsula polissacarídica através da membrana externa de *N. meningitidis*; o gene *lytA*, responsável pela produção da autolisina em *S. pneumoniae*; e o gene *bexA*, responsável pela expressão da cápsula polissacarídica em *H. influenzae*.

As restrições para esta metodologia são:

- I) o gene *bexA*, alvo para a detecção de *H. influenzae*, apresenta diferenças estruturais entre os seis sorotipos de *H. influenzae*. Neste ensaio, a sonda (probe) utilizada irá detectar somente cepas de *H. influenzae* dos sorotipos "a, b, c, d". As cepas dos sorotipos "e" e "f", bem como as não-tipáveis, não serão detectadas por esse método;
- II) o gene *bexA* também não está presente em cepas não-capsuladas de Hi e
- III) como algumas cepas de *Streptococcus* do grupo viridans possuem o *lytA*, a detecção da presença deste gene poderia ser um resultado positivo para Spn ou *Streptococcus* do grupo viridans, como ocorre na PCR convencional.

### **Padronização da PCR para genogrupagem de *N. meningitidis***

Os sorogrupos de *N. meningitidis* são baseados em diferenças antigênicas de seus polissacarídeos capsulares e, geralmente, caracterizados pela reação de aglutinação em lâmina com diferentes anti-soros policlonais específicos para cada sorogrupo. Estes sorogrupos também podem ser caracterizados diretamente no LCR e no soro pela contraímunoeletroforese (CIE) e pelo teste de aglutinação do látex.

O ensaio de PCR multiplex pode ser utilizado como um método indireto para caracterizar estes sorogrupos diretamente no LCR e soro. Ele se baseia na detecção dos genes específicos relacionados à biossíntese dos polissacarídeos capsulares responsáveis pelos diferentes sorogrupos.

O IAL também padronizou a PCR para genogrupagem de *N. meningitidis*, tanto em versão convencional quanto

em tempo real, com base em trabalhos publicados por Taha<sup>5</sup> e Mothershed<sup>4</sup> *et al.*

Para a genogrupagem da *N. meningitidis* pela PCR convencional são pesquisados cinco genes específicos para os diferentes sorogrupos: genes *orf2* para o sorogrupo A, *siaD* para os sorogrupos B e C, *synF* para o sorogrupo W135 e *synG* para o sorogrupo Y. Na PCR em tempo real, a genogrupagem de *N. meningitidis* é baseada na detecção de seis genes específicos para os sorogrupos A (*orf2*), B e C (*siaD*), W135 (*synF*), Y (*synG*) e X (*xcbB*).

As duas metodologias são aplicadas somente em amostras de LCR e/ou soro que apresentarem, previamente, resultados positivos para a presença dos genes *crgA* ou *ctrA*. Embora não incluam iniciadores para a detecção de genes dos 12 sorogrupos de *N. meningitidis* existentes, as metodologias padronizadas englobam, pelo menos, os cinco sorogrupos prevalentes no mundo. A limitação do método consiste na falha da determinação do genogrupo em cerca de 20% das amostras previamente positivas para o gene *ctrA/crgA*. Entretanto, até o momento não foram encontradas restrições para o método.

## **Parâmetros avaliados**

### **Especificidade**

As metodologias de PCR convencional e em tempo real foram testadas contra um painel de 300 cepas pertencentes a 32 espécies diferentes. Ambos os métodos apresentaram especificidade e sensibilidade de 100%.

### **Limite mínimo de detecção de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae***

O limite mínimo de detecção da PCR depende do método utilizado. Para a PCR convencional os limites foram de 2 pg para *N. meningitidis* (aproximadamente 800 cópias do DNA alvo) e de 20 pg para *S. pneumoniae* e *H. influenzae* (em torno de 8.000 cópias do DNA alvo) na amostra. Por outro lado, os limites mínimos de detecção para a PCR em tempo real foram de 200 fg (aproximadamente 80 cópias do DNA alvo) para os três agentes (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*), sendo 10 a 100 vezes maior quando comparado com a PCR convencional.

### **Limite mínimo de detecção na genogrupagem de *N. meningitidis***

O limite mínimo de detecção da PCR de genogrupagem também vai depender do método utilizado. Para a PCR convencional os limites foram de 20 pg para *N. meningitidis* dos sorogrupos A, B e C (em torno de 8.000 cópias do DNA alvo) e de 2 ng para os sorogrupos W135 e Y (80.000 cópias do DNA alvo) na amostra.

Os limites mínimos de detecção para a PCR de genogrupagem em tempo real foram de 200 fg (em torno de 80 cópias), 2 pg (800 cópias), 20 pg (8.000 cópias), 200 pg (80.000 cópias) e de 2 fg (0,8 cópia) para *N. meningitidis* dos sorogrupos A e C, B, W135, Y e X, respectivamente.

## **Dados preliminares do uso da PCR no diagnóstico das meningites bacterianas**

Dados preliminares mostraram um aumento na positividade para *N. meningitidis* em relação à CIE de 31% com o emprego da PCR convencional e em tempo real. Se considerarmos os casos positivos para *S. pneumoniae* detectados pela PCR, a positividade total em relação à CIE aumenta em torno de 50% com o uso da PCR convencional e em tempo real.

## **Solicitação do exame (PCR para meningites bacterianas)**

A introdução e a aplicação desta nova metodologia visam reduzir o número de casos de meningite bacteriana com agente etiológico não-determinado. O IAL incluiu esta PCR no seu painel de exames laboratoriais; entretanto, em virtude de sua complexidade e alto custo, o método será introduzido na rede hospitalar de maneira controlada.

Em um primeiro momento, o IAL irá oferecer este exame apenas para dois hospitais da rede pública: o Instituto

de Infectologia Emílio Ribas e o Hospital Santa Marcelina – Itaquera. Os dois foram selecionados pelo IAL em conjunto com a Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória (DDTR), do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” (CVE), e o Subsistema de Vigilância Epidemiológica em Âmbito Hospitalar (SVEAH), órgãos da Coordenadoria de Controle de Doenças, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP). Para tanto, levou-se em consideração a demanda e a importância destes hospitais no diagnóstico e no tratamento das meningites bacterianas.

O exame de líquido e soro por PCR para a pesquisa de *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* encontra-se disponível para as duas unidades desde o dia 2 de abril de 2007.

### **Condições da amostra**

A mesma amostra destinada à CIE poderá ser utilizada para a PCR, devendo apresentar as seguintes condições:

- I. O volume ideal de 600 mL. Amostras com volumes menores que o ideal serão processadas, entretanto, o resultado do exame poderá ser prejudicado e esta observação constará no laudo;
- II. Apresentar características quimiocitológicas e/ou clínica compatíveis com as de meningite bacteriana;
- III. Estar acompanhada do formulário de requisição do exame devidamente preenchido, de forma legível, de preferência feito na ficha do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (Sinan). Este formulário deverá conter carimbo ou nome por escrito ou impresso do médico, sua assinatura ou rubrica e seu número no Conselho Regional de Medicina (CRM);
- IV. Ser encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz, através do Setor de Coleta, e ser registrada com o número IAL;
- V. Ser coletada em condições assépticas e estar devidamente acondicionada em tubo ou frasco íntegro (não esteja trincado, quebrado ou rachado);
- VI. Ser identificado, de forma legível, com o nome do paciente e tipo de amostra (LCR ou soro), o tubo/frasco contendo a amostra e
- VII. Ser encaminhada no gelo, no máximo 24 horas após a coleta. As amostras também poderão ser congeladas por longos períodos a -20°C ou -70°C e encaminhadas ao IAL congeladas.

Caso a amostra não esteja em conformidade com os critérios estabelecidos acima, a mesma será rejeitada e devolvida para a unidade requisitante.

### **Processamento das amostras**

As amostras serão processadas em no mínimo 12 horas após seu recebimento no laboratório.

### **Apresentação de resultado**

Os resultados do exame serão encaminhados na forma de laudo para a unidade requisitante. No laudo constará o seguinte resultado:

1. Presença de gene compatível com *N. meningitidis* ou *S. pneumoniae* ou *H. influenzae* por PCR convencional ou em tempo real.
2. Ausência de genes compatíveis com *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* por PCR convencional ou em tempo real.

## Ou para a genogrupagem de *N. meningitidis*

1. Presença de gene compatível com sorogrupo A, B, C, W135 ou Y de *N. meningitidis* por PCR convencional ou em tempo real.
2. Ausência de genes compatíveis com os sorogrupos A, B, C, W135 e Y de *N. meningitidis* por PCR convencional ou em tempo real.

## Referências bibliográficas

1. Carvalho, MGS, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee, L, Mayer, LW, Steigerwalt A, Whaley, M, Facklam, RR, Fields, B, Carlone J. Ades, EW, Dagan, R, Sampson JS. Evaluation and Improvement of Real-Time PCR detection assay to *lytA*, *ply*, and *psa* genes for detection of pneumococcal DNA. 2007. **J. Clin. Microbiol.** *In press*.
2. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septcemia using Real-Time PCR. **J. Clin. Microbiol.** 2001; 39:1553-1558.
3. Forbes KJ, Bruce, KD, Ball A, Pennington TH. Variation in length and sequence of porin (*ompP2*) alleles of non-capsulate *Haemophilus influenzae*. **Mol. Microbiol.** 1992; 6:2107-2112.
4. Mothershed, EA, Sacchi, CT, Whitney, AM, Barnett, G, Ajello, GW, Schmink, S, Mayer, LW, Phelan, M, Taylor, TH, Bernhardt, AA, Rosenstein, NE, Popovic T. Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol.** 2004; 42:320-328.
5. Taha, MK. 2000. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol.** 38:855-857.

---

### Correspondência/Correspondence to:

Cláudio T. Sacchi

Laboratório de Meningites Bacterianas, Seção de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz

Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira César

CEP: 01246-902 – São Paulo/SP – Brasil

Tel.: 55 (11) 3068-2899

E-mail: [csacchi@ial.sp.gov.br](mailto:csacchi@ial.sp.gov.br)



Bepa

Av. Dr. Arnaldo, 351 - 1º andar, s. 135 – CEP: 01246-000

São Paulo - SP - tels.: (11) 3066-8823 / 3066-8825

e-mail: [bepa@saude.sp.gov.br](mailto:bepa@saude.sp.gov.br)

Fale conosco

