

Artigo original

Avaliação de kits comerciais baseados em PCR multiplex em tempo real para diagnóstico de meningite bacteriana

Evaluation of commercial kits based on multiplex real time PCR for bacterial meningitis diagnosis

Maria Gisele Gonçalves^[1] , Fabio Takenori Higa^[1] , Lucila Okuyama Fukasawa^[1] ,
Gabriela Andrade de Carvalho^[2] , Bruno Silva Milagres^[2] , Maristela Marques Salgado^[1] 

^[1]Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças, Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia, Laboratório de Referência Nacional para o Diagnóstico de Meningite Bacteriana, São Paulo, São Paulo, Brasil

^[2]Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Meio Ambiente, Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública, Brasília, Distrito Federal, Brasil

Autor para correspondência

Maria Gisele Gonçalves

E-mail: maria.goncalves@ial.sp.gov.br

Instituição: Instituto Adolfo Lutz (IAL)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355, 11º andar, CEP: 01246-902. São Paulo, São Paulo, Brasil

Como citar

Gonçalves MG, Higa FT, Fukasawa LO, Carvalho GA, Milagres BS, Salgado MM. Avaliação de kits comerciais baseados em PCR multiplex em tempo real para diagnóstico de meningite bacteriana. BEPA, Bol. epidemiol. paul. 2023; 20: e39209. doi: <https://doi.org/10.57148/bepa.2023.v.20.39209>

Primeira submissão: 03/03/2023 • Aceito para publicação: 10/04/2023 • Publicação: 12/05/2023

Editora-chefe: Regiane Cardoso de Paula

Resumo

A meningite bacteriana (MB) continua sendo um problema mundial e uma grave ameaça à saúde pública. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de três kits comerciais (ALLPLEX™ Meningitis-B Assay/ Seegene Inc., Coreia do Sul; VIASURE™ *H.influenzae*, *N.meningitidis* & *S.pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit/CerTest Biotec, Espanha; XGEN™ Multi MB/Mobius Life Science, Brasil), para a detecção simultânea de *Neisseria meningitidis* (Nm), *Streptococcus pneumoniae* (Spn) e *Haemophilus influenzae* (Hi). O desempenho de três kits comerciais foi comparado com o ensaio molecular *in house*, utilizado rotineiramente no Instituto Adolfo Lutz/SP/Brasil (IAL). Tanto os ensaios comerciais quanto as estratégias *in house* são baseados no ensaio de PCR multiplex em tempo real (mqPCR). O mqPCR padronizado pelo IAL (mqPCR/IAL) foi introduzido na rotina diagnóstica da MB desde 2010 e foi considerado teste de referência neste estudo. Um total de 100 amostras clínicas (líquido cefalorraquidiano = 62; soro = 38) foram testadas utilizando-se os três kits comerciais mqPCR, em comparação com o ensaio mqPCR/IAL, sendo 93 positivas para Nm, Spn ou Hi e 7 negativas. Para amostras de DNA-LCR, os resultados dos kits ALLPLEX™, VIASURE™ e XGEN™ apresentaram alta concordância com o ensaio mqPCR/IAL, apresentando mais de 93% de concordância e índice Kappa entre 0,61 e 0,80. Para amostras de DNA-soro, apenas o kit VIASURE™ foi comparado com o ensaio mqPCR/IAL, apresentando 100% de similaridade de concordância e índice Kappa = 1. Todos os três kits provaram ser competentes para detecção qualitativa de Nm, Spn e Hi e podem ser utilizados no diagnóstico de rotina da MB.

Palavras-chave: meningite bacteriana, diagnóstico, PCR em tempo real, kit de reagentes para diagnóstico.

Abstract

Bacterial meningitis (BM) remains a worldwide problem and a severe threat to public health. The purpose of this study was to evaluate the performance of three commercial kits (ALLPLEX™ Meningitis-B Assay/ Seegene Inc., South Korea; VIASURE™ *H.influenzae*, *N.meningitidis* & *S.pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit/CerTest Biotec, Spain; XGEN™ Multi MB/Mobius Life Science, Brazil) for the simultaneous detection of *Neisseria meningitidis* (Nm), *Streptococcus pneumoniae* (Spn) and *Haemophilus influenzae* (Hi). The performance of three commercial kits was compared with "in house" molecular assay routinely used at the Instituto Adolfo Lutz/SP/Brazil (IAL). Both commercial and "in house" assays are based on multiplex real time PCR assay (mqPCR). The mqPCR standardized by IAL (mqPCR/IAL) was introduced in BM diagnostic routine since 2010, and it was considered as reference test in this study. A total of 100 clinical samples (cerebrospinal fluid= 62; serum= 38) were tested using the three commercial mqPCR kits in comparison with mqPCR/IAL assay, being 93 positives for Nm, Spn or Hi, and 7 negatives. For DNA-CSF samples, the results from ALLPLEX™, VIASURE™, and XGEN™ kits showed high agreement with mqPCR/IAL assay, presenting more than 93% of concordance and *Kappa* index between 0,61 and 0,80. For DNA-serum samples, only VIASURE™ kit was compared with mqPCR/IAL assay, presenting 100% of concordance similarity and *Kappa* index = 1. All the three kits proved to be competent for qualitative detection of Nm, Spn and Hi and they are able to be used in the routine diagnostics of BM.

Keywords: bacterial meningitis, diagnosis, real time PCR, reagent kits diagnostic.

Introdução

A meningite bacteriana (MB) representa uma doença grave e ainda constitui um grave problema de saúde pública com elevadas taxas de morbidade e mortalidade.¹ Desde 1980, os casos mais comuns de MB nos Estados Unidos, Europa e outros países desenvolvidos têm sido causadas por *Neisseria meningitidis* (Nm), *Streptococcus pneumoniae* (Spn), *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), estreptococo do grupo B e *Listeria monocytogenes*.² No Brasil, os principais patógenos envolvidos na MB são Nm, Spn e Hi, responsáveis pela maioria dos casos.^{3,4} Dados do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE-SP) mostram que a entrada de vacinas contra esses patógenos no Programa Nacional de Imunizações (Hib em 1999; Nm sorogrupo C e Spn (PCV10) em 2010) tiveram impacto relevante nos coeficientes de incidência (CI) de MB na população do estado. Na série histórica avaliada pelo CVE-SP, nota-se que em 1998 o CI era de 17,5 casos de MB/100.000 habitantes, caindo para 3,8 casos de MB/100.000 habitantes em 2019 (https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/meningites/dados/meningites_dados.pdf).

O diagnóstico da MB baseia-se em manifestações clínicas, avaliação quimiocitológica e bacterioscopia no líquido cefalorraquidiano (LCR), testes diagnósticos bacteriológicos e, mais recentemente, testes diagnósticos moleculares.⁵ Entre os testes moleculares, a detecção do DNA dos três principais patógenos causadores de MB por PCR em tempo real (qPCR) tem auxiliado no diagnóstico deste agravo, e tem sido de grande importância na confirmação laboratorial dos casos de MB no Brasil. Este ensaio de qPCR, utilizado no Instituto Adolfo Lutz (IAL) desde 2010 no formato multiplex *in house* (mqPCR/IAL) capaz de detectar os três principais agentes etiológicos responsáveis pela MB (Nm, Spn e Hi), tem sido realizado em líquido, soro e fragmentos de tecido pós-óbito de indivíduos com suspeita de MB.⁶

O IAL, como Laboratório Central de Saúde Pública (Lacen) de São Paulo e Laboratório de Referência Nacional (IAL/LRN) para o diagnóstico de MB, tem como principais atribuições o desenvolvimento, incorporação e transferência de tecnologias para a rede nacional, padronização de novas técnicas e controle de qualidade, visando à eficiência, eficácia e conformidade do sistema laboratorial. Desde 2010, o mqPCR/IAL tem sido implantado nos Lacen de vários estados brasileiros, como resultado da parceria com a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública da Secretaria de Vigilância em Saúde e Meio Ambiente – Ministério da Saúde (CGLAB/SVSA/MS). No entanto, no Serviço Público (estadual ou federal) há grande dificuldade de aquisição de insumos para a realização de diagnóstico molecular *in house*, em que todos os reagentes são adquiridos separadamente (Ofício Circular nº 17/2021/CGLAB/DAEVS/SVS/MS de 23/07/21).

Com o avanço tecnológico, empresas multinacionais têm investido no desenvolvimento de kits comerciais de diagnóstico molecular para MB. Embora existam kits comerciais de diagnóstico molecular no mercado internacional, no Brasil apenas três kits possuem registro aprovado pela ANVISA, fator fundamental para aquisição desses produtos pelo Serviço Público e para uso em diagnóstico humano.

Esses três kits comerciais registrados ainda não foram avaliados de forma independente para facilitar a implantação na rotina de diagnóstico molecular da MB no Brasil. O objetivo deste estudo foi comparar o desempenho dos kits, de três fabricantes diferentes, para detecção de Nm, Spn e Hi em amostras biológicas de pacientes com MB, com base no ensaio de referência (mqPCR/IAL), que vem sendo utilizado no Brasil como rotina diagnóstica da MB desde 2010.

Metodologia

Amostras clínicas

Um total de 100 amostras clínicas retrospectivas (líquido cefalorraquidiano-LCR = 62; soro = 38), positivas para Nm, Spn, Hi (n=93) ou negativas (n=7) foram testadas usando os três kits comerciais de mqPCR em comparação com o ensaio de referência mqPCR/IAL^{6,7} e essas amostras foram selecionadas no banco de dados do Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (SIGH) de 2020 a 2021. Filtros foram usados no sistema SIGH para selecionar amostras por resultados de mqPCR/IAL, valor de Ct e tipo de material. Amostras com Ct ≤ 38 foram consideradas positivas. A Tabela 1 apresenta a distribuição de amostras clínicas com base nos resultados de mqPCR/IAL e na faixa de valores de Ct.

Tabela 1. Distribuição das amostras clínicas (n = 100) selecionadas de acordo com os resultados de mqPCR/IAL e valores iniciais de Ct.

| Resultados de mqPCR/IAL | LCR (faixa de Ct) | Soro (faixa de Ct) |
|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Nm positivas | 23 (16-38) | 11 (21-38) |
| Spn positivas | 22 (12-37) | 18 (25-38) |
| Hi positivas | 12 (15-35) | 7 (26-36) |
| Negativas (p/ Nm, Spn, Hi) | 5 (0) | 2 (0) |
| Total | 62 (12-38; 0) | 38 (21-38; 0) |

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

LCR: líquido cefalorraquidiano; Nm: N. meningitidis; Spn: S. pneumoniae; Hi: H. influenzae.

Extração de DNA

O "MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I" (Roche Diagnostics) foi utilizado para extração automatizada das amostras clínicas (200uL de LCR ou soro) no equipamento MagNA Pure LC2.0, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA das amostras foi eluído em 100uL e armazenado a -20°C. Diferentes extrações foram realizadas para os kits ALLPLEX™ (Seegene, Seoul, Korea) e XGEN™ (Mobius Life Science – Comércio de Produto para Laboratórios Ltda, Pinhais-PR, Brasil), devido à necessidade de incluir nas amostras o controle interno (IC) específico para cada kit, conforme instruções do fabricante. Para o ensaio mqPCR/IAL e kit mqPCR VIASURE™ (CerTest Biotec, S.L, Zaragoza, Espanha), o IC não foi adicionado às amostras na etapa de extração, pois não estão incluídos em seus protocolos.

PCR multiplex em tempo real (mqPCR)

Os kits comerciais empregados nas análises comparativas de desempenho estão descritos no Quadro 1. Esses kits são baseados na técnica de PCR em tempo real, em formato multiplex (mqPCR) e diferem em termos de composição, sondas marcadas e interpretação dos resultados e foram utilizados de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes. De forma simplificada, mqPCR/IAL, XGEN™ e VIASURE™ podem detectar simultaneamente os três importantes patógenos causadores de BM (Nm, Spn e Hi) em um único tubo. O kit ALLPLEX™ também pode detectar *L. monocytogenes* (Lm), *E. coli* K1 e estreptococos do grupo B, mas esses patógenos não estavam em nosso escopo de avaliação.

Quadro 1. Características dos kits comerciais testados para diagnóstico molecular de meningite bacteriana.

| Kit/Marca/Representante | Nome do kit no estudo | Fluoróforo-alvo | Tipos de amostra | Plataformas de qPCR |
|---|-----------------------|--|------------------|---|
| ALLPLEX Meningitis-B Assay/Seegene Inc./Seegene Brasil (Registro Anvisa: 80102512560) | ALLPLEX | Nm-FAM Spn-Cal Red 610 Hi-HEX CI-Quasar 670 | LCR | BioRad-CFX96-DX |
| VIASURE <i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> & <i>S. pneumoniae</i> Real Time PCR Detection Kit/ CerTest Biotec/Biomédica Equip. Suprim. Hospitalares (Registro Anvisa: 10355870381) | VIASURE | Nm-CY5 Spn-ROX Hi-FAM CI-VIC | LCR e soro | Applied-ABI 7500, BioRad-CFX96, Roche-LighCycler480 |
| XGEN Multi MB / Mobius / Mobius Life Science (Registro Anvisa: 80502070038) | XGEN | Nm-CY5 Spn-ROX Hi-FAM IC-FAM | LCR | ABI 7500, BioRad-CFX96, Roche-LighCycler480 |

Fonte: informações adaptadas do manual de instruções do fabricante/kit.

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Nm: *N. meningitidis*; Spn: *S. pneumoniae*; Hi: *H. influenzae*; CI: controle interno; LCR: líquido cefalorraquidiano.

As reações mqPCR/IAL^{6,7} e os kits de mqPCR selecionados para investigação foram realizados no mesmo dia e executados no mesmo equipamento qPCR, cada um com suas respectivas amostras de DNA e protocolos. Amostras com resultados discrepantes foram repetidas posteriormente. Para amostras de DNA submetidas à mqPCR/IAL, também foi utilizado o ensaio de RNaseP humana,⁸ como parte do protocolo diagnóstico de rotina para MB.

O seguinte equipamento foi usado para cada kit: BioRad CFX-DX para ALLPLEX™, Applied Biosystems 7500 para XGEN™ e VIASURE™ em amostras de LCR; Bio-Rad CFX96 para VIASURE™ em amostras de soro.

CrITÉRIOS de interpretação dos ensaios mqPCR/IAL e kits comerciais

Os critérios de interpretação dos valores de corte (*cut-off*) dos ensaios são apresentados na Tabela 2. As informações foram baseadas no limiar do ciclo (*Ct*: *cycle threshold*), o qual foi utilizado para definir amostras positivas ou negativas. Outros critérios de interpretação, como amplificação e curvas multicomponentes, estão descritos no protocolo ou bula dos kits. Deve-se observar que o kit XGEN™ não define um valor de corte de *Ct* para positividade. Assim, qualquer número > zero e ≤ 45 (número total de ciclos de reação de mqPCR) foi considerado como resultado positivo.

Tabela 2. Valores de corte (*cut-off*) de *Ct* para os kits/ensaio testados no diagnóstico molecular de meningite bacteriana.

| Resultado | mqPCR/IAL | ALLPLEX™ | XGEN™ | VIASURE™ |
|--------------|-------------|----------|---------|----------|
| Positivo | Ct ≤ 38 | Ct ≤ 45 | Ct ≤ 45 | Ct ≤ 39 |
| Inconclusivo | Ct = 39 | – | – | – |
| Negativo | Ct=0 e ≥ 40 | 0 | 0 | 0 e ≥ 40 |

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Ct: cycle threshold = ciclo de detecção/amplificação.

Os resultados foram interpretados de acordo com as instruções do fabricante. Como o valor do limite de positividade de *Ct* varia de acordo com o critério de cada desenvolvedor/fabricante em todos os ensaios/kits (*Ct* variando de 38 a 40), também foram analisadas as características das curvas exponenciais/lineares (inclinação e análise de regressão linear).

Análise de dados

O coeficiente *Kappa* (κ) dos kits m_qPCR foi calculado e comparado com o ensaio de referência m_qPCR/IAL realizado em paralelo, usando o pacote estatístico on-line GraphPad (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa2/>).⁹ Para efeito de cálculo, os resultados inconclusivos foram considerados negativos.

Os seguintes parâmetros foram usados para a interpretação da escala de índice kappa:¹

- Kappa < 0: sem concordância;
- Kappa entre 0,00 e 0,20: concordância muito baixa;
- Kappa entre 0,21 e 0,40: concordância baixa;
- Kappa entre 0,41 e 0,60: concordância moderada;
- Kappa entre 0,61 e 0,80: concordância alta;
- Kappa entre 0,81 e 1,00: concordância quase ou perfeita.

Declaração ética

O estudo foi aprovado pelo Conselho Técnico Científico do IAL (CTC: 47N/2021) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o protocolo do Ministério da Saúde CAAE – 58463922.1.0000.0059. Os dados foram analisados respeitando estritamente as diretrizes de confidencialidade do paciente.

Resultados

Todos os kits comerciais testados com DNA de LCR apresentaram elevada concordância (>90%), com o teste de referência m_qPCR/IAL. Os ensaios ALLPLEX™ e XGEN™ apresentaram 95,16% de concordância ($\kappa=0,796$ e $\kappa=0,774$, respectivamente) e 93,55% de concordância foi obtido quando as amostras foram testadas com VIASURE™ ($\kappa=0,679$) (Tabela 3A-3D). O DNA dos soros positivos ou negativos para Nm, Spn e Hi foi testado apenas com VIASURE™ e apresentou 100% de concordância com m_qPCR/IAL ($\kappa=1$). Os resultados obtidos na avaliação dos kits comerciais comparados em paralelo com o teste de referência m_qPCR/IAL apresentaram também, elevada concordância (>90%) (Tabela 3A-3D).

Tabela 3. Desempenho dos kits comerciais testados para o diagnóstico molecular de meningites bacterianas em comparação com o teste de referência mqPCR/IAL em LCR (n = 62) ou soro (n = 38): ALLPLEX™ em LCR (A); XGEN™ em LCR (B), VIASURE™ em LCR (C) ou amostras de soro (D).

A. ALLPLEX™ vs. mqPCR/IAL (amostras de LCR)

| mqPCR/IAL | Positivo | Negativo | Total |
|--------------|----------|----------|-------|
| kit ALLPLEX™ | | | |
| Positivo | 52 | 1 | 53 |
| Negativo | 2 | 7 | 9 |
| Total | 54 | 8 | 62 |

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Concordância: 95,16% (59/62) (k = 0,796; IC95%: 0,573-1,000).

B. XGEN™ vs. mqPCR/IAL (amostras de LCR)

| mqPCR/IAL | Positivo | Negativo | Total |
|-----------|----------|----------|-------|
| kit XGEN™ | | | |
| Positivo | 53 | 3 | 56 |
| Negativo | 0 | 6 | 6 |
| Total | 53 | 9 | 62 |

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Concordância: 95,16% (59/62) (k = 0,774; IC95%: 0,530-1,000).

C. VIASURE™ vs. mqPCR/IAL (amostras de LCR)

| mqPCR/IAL | Positivo | Negativo | Total |
|--------------|----------|----------|-------|
| kit VIASURE™ | | | |
| Positivo | 53 | 3 | 56 |
| Negativo | 1 | 5 | 6 |
| Total | 54 | 8 | 62 |

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Concordância: 93,55% (58/62) (k = 0,679; IC95%: 0,386-0,972).

D. VIASURE™ vs. mqPCR/IAL (amostras de soro)

| mqPCR/IAL | Positivo | Negativo | Total |
|--------------|----------|----------|-------|
| kit VIASURE™ | | | |
| Positivo | 36 | 0 | 36 |
| Negativo | 0 | 2 | 2 |
| Total | 36 | 2 | 38 |

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Concordância: 100% (38/38) (k = 1,000; IC95%: 1,000-1,000).

As Tabelas 4 e 5 mostram os resultados comparativos dos kits comerciais *versus* mqPCR/IAL em todos os LCR e soros, respectivamente.

Tabela 4. Resultados comparativos dos kits comerciais *versus* mqPCR/IAL. Resultados positivos (+) ou negativos (NEG) em amostras de DNA-LCR suspeitas de MB.

| LCR | Diagnóstico inicial | Ct inicial | ALLPLEX™ – Equipamento BIORAD CFX96-Dx | | XGEN™ – Equipamento ABI7500 | | VIASURE™ – Equipamento ABI7500 | | Resultado Final |
|-----|---------------------|------------|--|----------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------|
| | | | ALLPLEX | mqPCR - IAL (mesmo dia) | XGEN | mqPCR - IAL (mesmo dia) | VIASURE | mqPCR – IAL (mesmo dia) | |
| 1 | Nm | 16 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 2 | Nm | 17 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 3 | Nm | 24 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 4 | Nm | 24 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 5 | Nm | 24 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 6 | Nm | 28 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 7 | Nm | 28 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 8 | Nm | 29 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 9 | Nm | 29 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 10 | Nm | 30 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 11 | Spn | 12 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 12 | Spn | 13 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 13 | Spn | 15 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 14 | Spn | 27 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 15 | Spn | 27 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 16 | Spn | 29 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 17 | Spn | 31 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 18 | Spn | 33 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 19* | Spn | 36 | NEG | + | + | + | + | + | Spn |
| 20 | Hi | 15 | + | + | + | + | + | + | Hi |
| 21 | Hi | 16 | + | + | + | + | + | + | Hi |
| 22 | Hi | 19 | + | + | + | + | + | + | Hi |
| 23 | Hi | 22 | + | + | + | + | + | + | Hi |
| 24 | Hi | 25 | + | + | + | + | + | + | Hi |
| 25 | Hi | 31 | + | + | + | + | + | + | Hi |
| 26 | Hi | 31 | + | + | + | + | + | + | Hi |
| 27 | Hi | 32 | + | + | + | + | + | + | Hi |
| 28 | Hi | 32 | + | + | + | + | + | + | Hi |
| 29* | Hi | 35 | + | + | + | Hi INC | + | Hi INC | Hi |
| 30 | NEG | 0 | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| 31 | NEG | 0 | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| 32 | NEG | 0 | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| 33* | Nm | 38 | NEG | NEG | NEG | NEG | + | NEG | NEG |
| 34* | Nm | 38 | + | NEG | + | NEG | + | NEG | Nm |
| 35 | Nm | 35 | + | + | + | + | + | + | Nm |

continua

| LCR | Diagnóstico inicial | Ct inicial | ALLPLEX™ – Equipamento BIORAD CFX96-Dx | | XGEN™ – Equipamento ABI7500 | | VIASURE™ – Equipamento ABI7500 | | Resultado Final |
|-----|---------------------|------------|--|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------|
| | | | ALLPLEX | mqPCR - IAL (mesmo dia) | XGEN | mqPCR -IAL (mesmo dia) | VIASURE | mqPCR – IAL (mesmo dia) | |
| 36 | Nm | 33 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 37 | Nm | 32 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 38 | Nm | 31 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 39 | Nm | 29 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 40 | Nm | 28 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 41 | Nm | 27 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 42 | Nm | 27 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 43 | Nm | 26 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 44 | Nm | 24 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 45 | Nm | 24 | + | + | + | + | + | + | Nm |
| 46* | Spn | 37 | NEG | + | + | + | + | + | Spn |
| 47* | Spn | 36 | NEG | NEG | + | NEG | NEG | + | Spn |
| 48 | Spn | 33 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 49 | Spn | 32 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 50 | Spn | 31 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 51 | Spn | 31 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 52 | Spn | 29 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 53 | Spn | 29 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 54 | Spn | 28 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 55 | Spn | 27 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 56 | Spn | 26 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 57 | Spn | 25 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 58 | Spn | 25 | + | + | + | + | + | + | Spn |
| 59 | Hi | 28 | + | + | + | + | + | + | Hi |
| 60 | Hi | 25 | + | + | + | + | + | + | Hi |
| 61 | NEG | 0 | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| 62 | NEG | 0 | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

LCR: Líquido cefalorraquidiano; Nm: N. meningitidis; Spn: S. pneumoniae; Hi: H. influenzae; NEG: negativo; *resultados discordantes; Ct: cycle threshold = ciclo de detecção/amplificação.

Tabela 5. Resultados comparativos do kit comercial VIASURE™ versus mqPCR/IAL. Resultados positivos (+) ou negativos (NEG) em amostras de DNA-soro suspeitas de MB.

| VIASURE™ – Equipamento BIORAD CFX96 | | | | | |
|-------------------------------------|---------------------|------------|---------|------------------------|-----------------|
| Soro | Diagnóstico inicial | Ct inicial | VIASURE | mqPCR -IAL (mesmo dia) | Resultado final |
| 1 | Nm | 38 | + | + | Nm |
| 2 | Nm | 38 | + | + | Nm |
| 3 | Nm | 38 | + | + | Nm |
| 4 | Nm | 38 | + | + | Nm |
| 5 | Nm | 37 | + | + | Nm |
| 6 | Nm | 33 | + | + | Nm |
| 7 | Nm | 32 | + | + | Nm |
| 8 | Spn | 38 | + | + | Spn |
| 9 | Spn | 38 | + | + | Spn |
| 10 | Spn | 37 | + | + | Spn |
| 11 | Spn | 36 | + | + | Spn |
| 12 | Spn | 36 | + | + | Spn |
| 13 | Spn | 36 | + | + | Spn |
| 14 | Spn | 35 | + | + | Spn |
| 15 | Spn | 35 | + | + | Spn |
| 16 | Spn | 35 | + | + | Spn |
| 17 | Hi | 36 | + | + | Hi |
| 18 | Hi | 35 | + | + | Hi |
| 19 | Hi | 35 | + | + | Hi |
| 20 | Hi | 35 | + | + | Hi |
| 21 | Hi | 34 | + | + | Hi |
| 22 | Hi | 30 | + | + | Hi |
| 23 | Hi | 26 | + | + | Hi |
| 24 | NEG | 0 | NEG | NEG | Neg |
| 25 | Nm | 30 | + | + | Nm |
| 26 | Nm | 28 | + | + | Nm |
| 27 | Nm | 22 | + | + | Nm |
| 28 | Nm | 21 | + | + | Nm |

continua

| VIASURE™ – Equipamento BIORAD CFX96 | | | | | |
|-------------------------------------|---------------------|------------|---------|------------------------|-----------------|
| Soro | Diagnóstico inicial | Ct inicial | VIASURE | mqPCR -IAL (mesmo dia) | Resultado final |
| 29 | Spn | 34 | + | + | Spn |
| 30 | Spn | 34 | + | + | Spn |
| 31 | Spn | 33 | + | + | Spn |
| 32 | Spn | 33 | + | + | Spn |
| 33 | Spn | 31 | + | + | Spn |
| 34 | Spn | 30 | + | + | Spn |
| 35 | Spn | 30 | + | + | Spn |
| 36 | Spn | 27 | + | + | Spn |
| 37 | Spn | 25 | + | + | Spn |
| 38 | NEG | 0 | NEG | NEG | Neg |

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Nm: N. meningitidis; Spn: S. pneumoniae; Hi: H. influenzae; NEG: negativo; Ct: cycle threshold = ciclo de detecção/amplificação.

Discussão

A mqPCR tem se mostrado uma ferramenta eficiente no diagnóstico e confirmação laboratorial dos casos de meningite bacteriana (MB) em todo o mundo, permitindo assim a detecção múltipla dos principais agentes causadores da doença. Embora o estudo de Sacchi *et al.*⁶ tenha demonstrado sua excelência no diagnóstico de MB, e na implantação do mqPCR no Brasil, é importante considerar as dificuldades em adquirir os insumos necessários ao desenvolvimento de uma rotina diagnóstica em laboratórios de saúde pública. Apesar do teste *in house* apresentar um melhor custo-benefício do que os kits comerciais, nem sempre é fácil adquirir todos os insumos necessários simultaneamente, fato que pode afetar a rotina de diagnóstico do laboratório. Esse fato é considerado relevante quando se considera a gravidade da doença infecciosa, a qual traz consigo elevadas taxas de mortalidade e casos de sequelas graves como a MB, em que o diagnóstico laboratorial pode ser crucial.

Atualmente, várias empresas têm investido na produção de kits para diagnóstico molecular por mqPCR para diversas doenças, inclusive a MB. A produção em formato de kit possibilita sua realização em laboratórios clínicos (públicos ou particulares), pois não necessita adquirir reagentes em separado e não depende da padronização interna da reação. No entanto, as empresas precisam apresentar registro na ANVISA e, ao mesmo tempo, garantir o abastecimento no mercado brasileiro.

Para enfrentar o problema de fornecimento de reagentes, o Ministério da Saúde (CGLAB/SVSA/MS) decidiu avaliar três kits comerciais de diagnóstico molecular em parceria com o IAL/LRN. Este estudo fornecerá melhores subsídios para decisões de políticas públicas e gestão de recursos públicos, de forma a contribuir para o fornecimento de reagentes para o diagnóstico molecular de MB em nível nacional.

Levando-se em consideração os três kits avaliados neste estudo em comparação com o ensaio de referência m_qPCR/IAL em termos de genes-alvo para Nm, Spn e Hi, o kit VIASURE™ mostrou ser semelhante ao m_qPCR/IAL, ambos usando o gene *ctrA* para Nm, *lytA* para Spn e *hpd* para Hi. O kit VIASURE™ usa dois genes alvo para Spn: *lytA* e *piaA*. Não há informações sobre os genes-alvo utilizados pelos outros dois kits ALLPLEX™ e XGEN™.

O Quadro 2 (abaixo) descreve resumidamente as características observadas quanto à formatação e apresentação dos kits para o diagnóstico de MB.

Quadro 2. Características gerais dos kits comerciais avaliados neste estudo.

| | ALLPLEX™ | VIASURE™ | XGEN™ |
|---|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| O kit é validado para amostras de LCR (DNA)? | Sim | Sim | Sim |
| O kit é validado para amostras de soro (DNA)? | Não | Sim | Não |
| O kit detecta simultaneamente Nm, Spn e Hi? | Sim | Sim | Sim |
| O kit detecta simultaneamente outros patógenos causadores de meningite? | Sim* | Não | Não |
| O kit vem com placa/tubo? | Não | Sim | Não |
| O kit requer placa/tubo/ selante/tampa específicos para sua utilização? | Sim | Não | Não |
| O kit vem com <i>master mix</i> , oligonucleotídeos e controles? | Sim | Sim | Sim |
| Condições de armazenamento e/ou transporte | Gelo-seco/ Freezer | Temperatura ambiente | Temperatura ambiente |
| O kit possui um controle interno que avalia o processo de extração de ácidos nucleicos? | Sim | Não | Sim |
| O kit avalia a qualidade da amostra clínica extraída (controle endógeno)? | Não | Não | Não |
| O kit é apresentado em teste/reação? | Sim | Sim | Sim |
| O kit funciona em diferentes plataformas (ABI, Bio-Rad ou Roche)? | Não** | Sim | Sim |
| O kit requer <i>software</i> específico para análise e interpretação dos resultados? | Sim*** | Não | Não |
| O kit permite a intervenção do usuário na análise dos parâmetros do <i>software</i> ? | Não | Sim | Sim |

Fonte: informações adaptadas do manual de instruções do fabricante e apresentação do kit.

**Listeria monocytogenes* (Lm), *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Escherichia coli* K1 (Ec K1);

**apenas BioRad, CFX96-DX;

***Bio-Rad CFX-96 Seegene Viewer.

É importante ressaltar que os resultados da PCR estão diretamente relacionados com a carga bacteriana da amostra clínica. Se houver baixa carga bacteriana os resultados podem ser inconsistentes, apresentando resultados negativos ou positivos para a mesma amostra em repetições do ensaio. Nesse sentido, os resultados discordantes podem ser parcialmente explicados pela distribuição de *Poisson*. Considerando-se os valores iniciais de Ct de m_qPCR/IAL para amostras de DNA-LCR (12-38), não foi detectado nenhum resultado conflitante entre kits comerciais *versus* m_qPCR/IAL (testado em paralelo) quando o valor de Ct foi ≤ 34 . No entanto, alguns resultados inconsistentes em seis amostras de DNA-LCR foram detectados quando o Ct foi maior do que 34. Essas amostras, positivas para Nm, Spn ou Hi (Ct 35-38), foram repetidas, mas não confirmaram o resultado, mostrando correlação direta entre maior valor de Ct, menor quantidade de DNA nas amostras e resultados negativos, independentemente do tipo de ensaio (comercial ou *in house*) ou patógeno detectado. Esses resultados inconsistentes refletem a possibilidade de ensaios comerciais ou *in house* apresentarem resultado negativo quando há concentração muito baixa de DNA na amostra, pois em amostras com esse perfil há maior dificuldade de reproduzir o resultado quando testadas em replicatas. Ademais, diferentes formulações entre kits e/ou ensaios podem apresentar diferenças na sensibilidade para detectar um determinado patógeno, gerando resultados discordantes.

Por fim, o presente estudo apresenta algumas limitações, tais como: (i) não foi utilizado o mesmo DNA extraído para todos os kits/ensaios, pois dois deles (ALLPLEX™ e XGEN™) exigiram o uso de controle interno específico durante a extração do DNA; (ii) o mesmo equipamento qPCR não foi utilizado para testar todos os kits, pois o kit ALLPLEX™ precisava ser executado apenas no Bio-Rad DX e os outros dois kits não foram validados para este equipamento específico; (iii) a quantidade de testes disponíveis por kit foi insuficiente para determinar o limite mínimo de detecção e precisão inter/intra-ensaio para cada kit em amostras clínicas para os três patógenos causadores de MB. Assim, a comparação mais justa neste estudo foi entre o kit comercial e o m_qPCR/IAL que utilizou o mesmo DNA, equipamento e foi executado no mesmo dia. As comparações de desempenho entre os 3 kits podem ser tendenciosas. De qualquer forma, as performances dos 3 kits foram semelhantes.

Considerações finais

- i. Nenhum dos kits comerciais inclui um gene constitutivo humano, como a RNaseP, em sua formulação. Assim, não é possível avaliar se o processo de coleta, acondicionamento, armazenamento e/ou transporte do material biológico foi adequado para não afetar os resultados da qPCR.

- ii. A adição do Controle Interno (presente em 2 kits: ALLPLEX™ e XGEN™) à amostra, desde o momento da extração, permite monitorar possíveis erros técnicos, além de avaliar o processo de extração do DNA.
- iii. Embora o kit ALLPLEX™ tenha a capacidade de ampliar a busca de patógenos importantes para o diagnóstico laboratorial da MB, como *Listeria monocytogenes* (LM), *Escherichia coli* K1 (Ec K1) e *Streptococcus agalactiae* grupo B (GBS), para este estudo foram considerados apenas os patógenos comuns a todos os kits avaliados (Nm, Spn e Hi).
- iv. Os resultados apresentados neste estudo são apenas para avaliação dos kits utilizados no diagnóstico molecular da MB a pedido da CGLAB/SVSA/MS, não podendo ser utilizados para fins comerciais pelos fabricantes ou como critério de validação destes kits em amostras clínicas.

Conclusão

Os kits ALLPLEX™ Meningitis-B Assay (Seegene), VIASURE™ *H.influenzae*, *N.meningitidis* e *S.pneumoniae* PCR em tempo real (CerTest Biotec) e os kits XGEN™ Multi MB (Mobius Life Science) provaram ser competentes na detecção qualitativa de Nm, Spn e Hi e podem ser utilizados no diagnóstico molecular da MB em amostras clínicas conforme indicado pelos referidos kits.

Referências

1. Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin microbiol rev.* 2010; 23(3): 467-92. <https://doi.org/10.1128/cmr.00070-09>
2. Bottomley MJ, Serruto D, Sáfadi MAP, Klugman KP. Future challenges in the elimination of bacterial meningitis. *Vaccine.* 2012; 30S: B78-B86. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.099>
3. L. Liphais B, Cobo Zanella R, Paula S. Lemos A, C. G. Almeida S, Chimara E, M. Blanco R, T. Higa F, Gisele Gonçalves M, M. Salgado M, O. Fukasawa L, Cristina Pereira dos Santos F, R.M.P. Carvalhanas T. Meningites Bacterianas: Diagnóstico e Caracterização Laboratorial dos Agentes Etiológicos. *Bepa* [Internet]. 30º de novembro de 2021 [citado 2º de março de 2023];18(215):69-86. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/37236>
4. Marques Pinto Carvalhanas TR, de Cunto Brandileone MC, Cobo Zanella R. Meningites Bacterianas. *Bepa* [Internet]. 31º de maio de 2005 [citado 2º de março de 2023];2(17):15-26. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/38902>
5. Obaro S. Updating the diagnosis of bacterial meningitis. *Lancet infect dis.* 2019; 19: 1160-1. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30549-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30549-3).
6. 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): e20675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020675>. Epub 2011 Jun22. PMID: 21731621; PMCID: PMC3120771.
7. Salgado MM, Higa FT, Gonçalves MG, Fukasawa LO, Liphais BL, Oliveira PL, et al. Nova versão do ensaio da PCR em tempo real para o diagnóstico laboratorial e vigilância epidemiológica das meningites bacterianas. *BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista.* 2012; 9(103): 16-20. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2012/ses-28039/ses-28039-4714.pdf>
8. Emery SL, Erdman DD, Bowen MD, Newton BR, Winchell JM, Meyer RF, et al. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg infect dis.* 2004 Feb; 10(2): 311-6. <https://doi.org/10.3201/eid1002.030759>. PMID: 15030703; PMCID: PMC3322901.
9. Landis, JR; Koch, GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33 (1): 159-74. <https://doi.org/10.2307/2529310>

Contribuição dos autores

MGG, MMS e LOF conceberam e projetaram os experimentos e escreveram o manuscrito; MGG, FHT e LOF realizaram os experimentos; MGG, FHT, LOF e MMS analisaram os dados; MMS, GAC e BSM revisaram o manuscrito.

Aprovação dos autores

Todos os autores aprovaram a versão final do manuscrito a ser publicada e são responsáveis por todos os aspectos do trabalho, incluindo a garantia de sua precisão e integridade.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse com as empresas fabricantes dos kits diagnósticos.

Financiamento

Não há fonte financiadora.