




## Relato de experiência

# Utilização de ensaios de PCR em tempo real *in house* na rotina diagnóstica de meningites bacterianas nos Laboratórios de Saúde Pública do país

Use of *in-house* real-time PCR assays in routine diagnosis of bacterial meningitis in the country's Public Health Laboratories

Lucila Okuyama Fukasawa<sup>[1]</sup> , Maria Gisele Gonçalves<sup>[1]</sup> , Fábio Takenori Higa<sup>[1]</sup> , Maristela Marques Salgado<sup>[1]</sup> , Claudio Tavares Sacchi<sup>[2]</sup> 

<sup>[1]</sup>Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças, Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia, São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>[2]</sup>Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças, Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Estratégico, São Paulo, São Paulo, Brasil

## Autor para correspondência

Lucila Okuyama Fukasawa

E-mail: lucila.fukasawa@ial.sp.gov.br

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

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

## Como citar

Fukasawa LO, Gonçalves MG, Higa FT, Salgado MM, Sacchi CT. Utilização de ensaios de PCR em tempo real *in house* na rotina diagnóstica de meningites bacterianas nos Laboratórios de Saúde Pública do país. BEPA, Bol. epidemiol. paul. 2024; 21: e40954. doi: <https://doi.org/10.57148/bepa.2024.v.21.40954>

Primeira submissão: 31/10/2024 • Aceito para publicação: 07/11/2024 • Publicação: 25/11/2024

Editora-chefe: Regiane Cardoso de Paula

## Resumo

Este trabalho descreve a experiência do Instituto Adolfo Lutz (IAL) na implantação de ensaios de PCR em tempo real (qPCR) *in house*, aplicados ao diagnóstico de meningites bacterianas (MB) causadas por *Neisseria meningitidis* (Nm), *Streptococcus pneumoniae* (Spn) e *Haemophilus influenzae* (Hi). São apresentadas estratégias para o aprimoramento dos ensaios de qPCR originalmente propostos, incluindo avaliação de diferentes alvos genéticos e incorporação de controle interno da qualidade pela detecção de gene constitutivo humano (RNase P) nas amostras biológicas processadas na rotina. Descreve também os ensaios de qPCR estabelecidos para identificação dos principais genogrupos de Nm e dos seis genotipos de Hi, que geram informações capazes de contribuir para a avaliação da efetividade das vacinas conjugadas presentes no Programa Nacional de Imunização. O trabalho mostra, ainda, o repasse dos ensaios de qPCR para outros laboratórios de saúde pública do país e a contribuição do uso desses ensaios na vigilância laboratorial das MB. Ademais, apresenta outras contribuições do IAL para o aprimoramento do diagnóstico laboratorial da meningite, como a produção de controles genéticos distribuídos para os laboratórios públicos do país, a avaliação do uso de cartões de papel de filtro no transporte de amostras clínicas entre laboratório local e de referência e a avaliação de kits comerciais empregados no diagnóstico das MB. Por último, menciona as considerações finais do trabalho, com reflexões acerca do futuro do uso dos ensaios de qPCR no diagnóstico laboratorial das MB.

**Palavras-chave:** meningites bacterianas, diagnóstico molecular, reação em cadeia da polimerase em tempo real, vigilância epidemiológica, laboratório de saúde pública.

## Abstract

This paper describes the experience of the Instituto Adolfo Lutz (IAL) in implementing in-house real-time PCR (qPCR) assays used in the diagnosis of bacterial meningitis (BM) caused by *Neisseria meningitidis* (Nm), *Streptococcus pneumoniae* (Spn) and *Haemophilus influenzae* (Hi). Strategies for improving the originally proposed qPCR assays are presented, including the evaluation of different genetic targets and incorporation of internal quality control by human constitutive gene detection (RNase P) in biological samples processed in routine. It describes the qPCR assays established to identify the main Nm genogroups and the six Hi genotypes, which generate information that can contribute to evaluating the effectiveness of conjugate vaccines present in the National Immunization Program. It shows the transfer of qPCR assays to other Public Health Laboratories in the country and the contribution of using these assays in BM laboratory surveillance. Furthermore, it presents other IAL contributions to improve BM laboratory diagnosis, such as the production of genetic controls that are distributed to Brazilian public laboratories, the evaluation of the use of filter paper cards for transporting clinical samples between local and reference laboratories, and the evaluation of commercial kits used in the BM diagnosis. Finally, it mentions the final considerations of the work, with reflections on the future of using qPCR assays in the laboratory diagnosis of BM.

**Keywords:** bacterial meningitis, molecular diagnosis, real-time polymerase chain reaction, epidemiological surveillance, public health laboratory.

## Introdução

Em janeiro de 2025, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) celebrará, com sucesso, quinze anos da introdução da metodologia de PCR em tempo real (qPCR) no diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas (MB). Foram introduzidos ensaios de qPCR *in house* para detecção dos principais agentes etiológicos das MB, *Neisseria meningitidis* (Nm), *Streptococcus pneumoniae* (Spn) e *Haemophilus influenzae* (Hi), bem como ensaios para identificação dos principais genótipos de Nm e genótipos de Hi. Os ensaios de qPCR foram repassados para 26 laboratórios de saúde pública (Lacen) do país, doze laboratórios públicos da América Latina e oito Centros de Laboratórios Regionais do IAL (CLR-IAL), localizados em cidades estratégicas do estado de São Paulo, expandindo a disponibilidade desses ensaios moleculares em nível nacional.

Nos próximos itens, descrevemos a experiência de nosso grupo na implantação de ensaios de qPCR *in house* apresentando os desafios e conquistas do uso desses ensaios na rotina diagnóstica das MB.

## Implantação dos ensaios de qPCR na rotina diagnóstica das MB

A meningite bacteriana (MB) ainda é uma preocupação em saúde pública pela gravidade dos casos e pela possibilidade de causar surtos e epidemias de rápida propagação. A doença é fatal em 15-30% dos infectados e em 20% deixa sequelas permanentes, como perda de visão ou audição, danos neurológicos e deficiência cognitiva.<sup>1,2</sup>

No estado de São Paulo, entre 2001 e 2006, apenas 50% dos casos de MB eram confirmados laboratorialmente por meio da cultura, teste de aglutinação do látex, contraímuno eletroforese (CIE) e bacterioscopia, que eram os testes diagnósticos disponíveis na ocasião.<sup>1,3</sup> A cultura é considerada o padrão-ouro para confirmação de casos de MB, mas apresenta baixa positividade pelo uso de antibióticos antes da coleta da amostra ou por condições inadequadas de armazenamento e/ou transporte do material biológico. Os testes de látex e CIE, embora sejam de simples execução, estão sujeitos à subjetividade de quem os aplica na interpretação dos resultados, podendo ser de difícil leitura em amostras com baixa carga bacteriana. Já a coloração de Gram é simples e de baixo custo, mas não confirma o agente etiológico, apenas dá uma ideia do gênero e espécie da bactéria.<sup>4,5</sup>

Diante desse cenário, era necessário introduzir novos testes laboratoriais com alta sensibilidade e especificidade, que não fossem sujeitos à interferência dos antibióticos e que permitissem a rápida identificação da bactéria, levando à confirmação dos casos suspeitos. Ensaios moleculares com base na reação em cadeia da polimerase (PCR) e que empregavam DNA extraído do material clínico eram utilizados com sucesso como ferramenta para ações de vigilância epidemiológica das MB causadas por Nm, Hi e Spn por vários laboratórios de referência no mundo.<sup>6,7,8</sup>

Nesse contexto, o IAL, como Laboratório de Referência Nacional para MB (portaria SVS/MS nº 191, de 13 de setembro de 2010), padronizou um ensaio de PCR em tempo real (qPCR) em formato multiplex para a detecção simultânea das três principais bactérias causadoras de meningite, Nm, Spn e Hi, utilizando como alvos os genes *ctrA* (proteína de transporte capsular), *lytA* (autolisina) e *bexA* (proteína envolvida na expressão da cápsula polissacarídica), respectivamente.<sup>9,10</sup> Esse ensaio de qPCR multiplex (mqPCR) foi incorporado na rotina diagnóstica do IAL em 2007, disponibilizado, inicialmente, para doze unidades sentinelas, das quais nove estavam localizadas no município de São Paulo e três em Campinas. O uso da mqPCR resultou em aumento de 85%, 52% e 20% na detecção de casos da doença causada por Nm, Spn e Hi em relação à cultura, respectivamente.<sup>9</sup> Comparando-se com a CIE, houve um aumento de 60% na positividade total com uso da mqPCR, uma vez que a CIE detectava somente Nm de alguns sorogrupos e Hi do sorotipo b e não detectava Spn.<sup>11</sup>

Em virtude dos excelentes resultados, a partir de 2010, o ensaio mqPCR passou a ser disponibilizado pelo IAL para todas as unidades de saúde pública da Região Metropolitana de São Paulo, substituindo o ensaio de CIE na rotina diagnóstica das MB. O ensaio também foi disponibilizado para outras regiões do país para esclarecimento de surtos ou para complementação diagnóstica quando havia solicitação do Ministério da Saúde ou da Vigilância Epidemiológica.

## Aprimoramento dos ensaios de qPCR

### Avaliação de diferentes alvos genéticos

A constante evolução dos microrganismos e a dinâmica da doença levam à busca por aperfeiçoamento permanente nos ensaios diagnósticos. Ao longo dos anos, modificações no ensaio originalmente proposto foram feitas e avaliadas, visando ampliar o espectro de bactérias detectadas, aumentar a sensibilidade e/ou especificidade do ensaio e contornar possíveis falhas pela presença de mutações nos genes-alvo empregados.

A possibilidade de ocorrência de casos de doença invasiva por Nm sem cápsula e com ausência do gene *ctrA* resultou na avaliação de outro alvo genético, *sodC* (superóxido dismutase), detectável em isolados bacterianos capsulados e não capsulados.<sup>12,13</sup> Nosso estudo demonstrou que a mqPCR com *sodC* foi 7,5% menos sensível que o ensaio com *ctrA* em 1.538 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) ou soro analisadas.<sup>13</sup> Por outro lado, em 483 amostras de *swab* de nasofaringe para estudo de portação de Nm, o uso da qPCR com *sodC* resultou em positividade 7% maior em relação ao ensaio com *ctrA* (dados não publicados). Com base nesses estudos, nosso grupo decidiu manter o gene *ctrA* no ensaio de mqPCR para diagnóstico molecular de MB e utilizar *sodC* em estudos de prevalência de portadores de Nm.<sup>14,15,16</sup>

Para Spn, os alvos *ply* (pneumolisina) e *lytA* foram avaliados quanto à sua especificidade, visto que cepas de *Streptococcus* do grupo *viridans* poderiam, eventualmente, possuir esses dois genes. Após avaliação de 242 cepas de *S. viridans* ou Spn por qPCR, utilizando os alvos *lytA* e *ply*, foram obtidas especificidades de 100% e 95%, respectivamente, o que resultou na escolha do *lytA* como alvo genético para Spn no ensaio de mqPCR.<sup>17</sup>

O ensaio de mqPCR originalmente proposto com *bexA* se limitava à detecção de cepas capsuladas de Hi dos sorotipos a, b, c, d<sup>18</sup> e não detectava cepas não capsuladas (não tipáveis, NT),<sup>8</sup> que eram responsáveis por 30% dos casos de doença invasiva por essa bactéria.<sup>19</sup> Um novo alvo genético *hpd* (proteína D),<sup>20</sup> presente em todos os seis sorotipos de Hi e nas cepas NT, foi avaliado, apresentando desempenho superior em relação ao *bexA*, com detecção de treze casos adicionais de Hi, doze Hi-NT e um Hif. Dessa forma, a partir de 2012, foi incorporado na rotina do IAL um novo formato do ensaio mqPCR com *hpd*, visando aprimorar o diagnóstico e monitorar a emergência de novos sorotipos de Hi circulantes.<sup>21</sup> De fato, em estudo recente, foi demonstrado que a substituição do gene *bexA* pelo *hpd* promoveu aumento de 37% na detecção de Hi entre casos suspeitos de MB, um terço por Hi-NT.<sup>22</sup>

### Incorporação de controle interno da qualidade

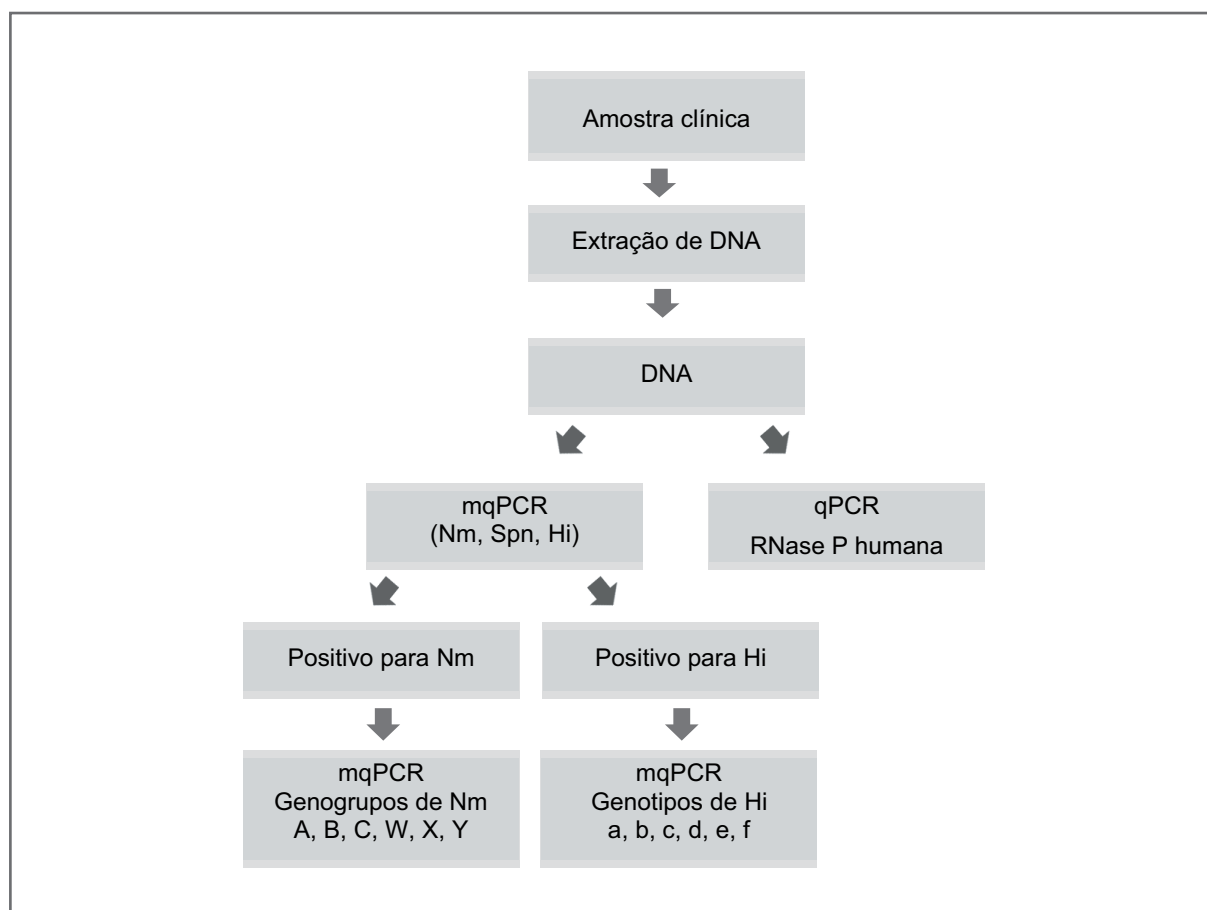
Em todos os ensaios de qPCR são utilizados, obrigatoriamente, controles positivos e negativos para garantir a qualidade dos reagentes e a funcionalidade correta dos equipamentos e para monitorar possíveis contaminações. Além desses controles, introduzimos na rotina um segundo ensaio de qPCR em formato individual para detecção de um gene constitutivo humano, ribonuclease P (RNase P)<sup>23</sup> como controle interno da qualidade. A detecção desse gene na amostra clínica garante: (i) que o processo de extração do DNA da amostra clínica foi eficiente com eliminação de potenciais inibidores da reação de PCR; (ii) que o material clínico processado foi acondicionado, transportado e armazenado de forma adequada. Assim, todo DNA extraído de amostra clínica encaminhada para diagnóstico molecular de MB é submetido simultaneamente a dois ensaios: mqPCR, para detecção de Nm, Spn e Hi, e qPCR, para detecção de RNase P (RP). A utilização da qPCR para RP possibilita validar os resultados do ensaio mqPCR, garantindo que um resultado negativo seja verdadeiro e não decorrente de intercorrências no processo de extração do DNA ou na conservação/transporte inadequado da amostra.

### Ensaio de qPCR para identificação dos genogrupos de Nm e genotipos de Hi

Para o sistema de vigilância epidemiológica é importante não só conhecer o agente bacteriano causador da doença, mas também identificar os sorogrupos de Nm e sorotipos de Hi ou Spn circulantes no país. Essa identificação é essencial para estabelecer e avaliar políticas públicas de imunização, uma vez que as vacinas contra essas bactérias

são sorogrupo/sorotipo específicos. Além disso, em situações de surto de doença meningocócica, a identificação do sorogrupo de Nm é fundamental para direcionar o tipo de vacina a ser aplicada para contenção da doença em uma comunidade/localidade. Nesse contexto, nosso grupo estabeleceu ensaios de mqPCR para detecção de genes específicos do sorogrupo/sorotipo envolvidos na biossíntese da cápsula polissacarídica, possibilitando a identificação presuntiva do tipo genético capsular de Nm (genogrupo) ou de Hi (genotipo). Foram estabelecidos ensaios de mqPCR para identificação dos seis principais genogrupos de Nm (A, B, C, W, Y e X)<sup>24</sup> e dos seis genotipos de Hi (a, b, c, d, e, f).<sup>25,26</sup> Assim, toda amostra positiva no ensaio mqPCR para Nm ou Hi é submetida aos ensaios de mqPCR para identificação do genogrupo/genotipo (Figura 1).

**Figura 1.** Fluxograma de processamento de amostras clínicas por ensaios de PCR em tempo real (qPCR).



qPCR: PCR em tempo real; mqPCR: PCR em tempo real multiplex; Nm: *Neisseria meningitidis*; Spn: *Streptococcus pneumoniae*; Hi: *Haemophilus influenzae*.

Em relação ao Spn, o Centers for Disease Control and Prevention (CDC-EUA) disponibilizou protocolos de mqPCR compostos de sete reações ou doze reações que possibilitam a identificação de 21 ou 64 genotipos, respectivamente.<sup>27,28</sup> Para fins de pesquisa na instituição, esses ensaios foram empregados em estudos de portação de Spn

em crianças e idosos<sup>29,30</sup> e na investigação epidemiológica de agregado de casos de doença pneumocócica invasiva, atendendo às solicitações da Coordenadoria Geral de Laboratórios de Saúde Pública do Ministério da Saúde (CGLAB/MS).

## Repasse dos ensaios de qPCR para os Lacen e outros laboratórios de saúde pública

Em decorrência da implantação exitosa dos ensaios de qPCR na rotina diagnóstica das MB no IAL, a CGLAB/MS solicitou o repasse desses ensaios para os Lacen do país. Entre 2007 e 2024, foram realizados treinamentos para todos os 26 Lacen, além do Instituto Evandro Chagas (PA). No estado de São Paulo foram treinados oito CLR-IAL (Bauru, Campinas, Ribeirão Preto, Santos, Santo André, São José do Rio Preto, Sorocaba, Taubaté) e o Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Inicialmente, os treinamentos foram realizados no IAL, mas, ao considerar as diferenças de infraestrutura dos Lacen e CLR-IAL, a partir de 2012 o IAL optou por realizar também treinamentos *in loco*, adaptando as condições de cada laboratório em relação às áreas físicas, ao parque de equipamentos e aos recursos humanos para implantação dos ensaios de qPCR na rotina diagnóstica das MB.

O Lacen Paraná foi o primeiro laboratório treinado a disponibilizar os ensaios de qPCR em sua rotina diagnóstica, em 2008. No estado de São Paulo, o CLR de São José do Rio Preto foi o primeiro laboratório regional do IAL a implantar essa metodologia para o diagnóstico das MB, em 2011.

Pela experiência exitosa no repasse dos ensaios de qPCR para laboratórios brasileiros, realizamos também treinamentos de profissionais de treze laboratórios de saúde pública da América Latina, entre 2012 e 2017, atendendo à solicitação da Organização Pan-Americana de Saúde: Argentina, Chile, Colômbia, Cuba, México (duas instituições), Panamá, Paraguai, Peru, República Dominicana, Trinidad e Tobago, Uruguai e Venezuela.

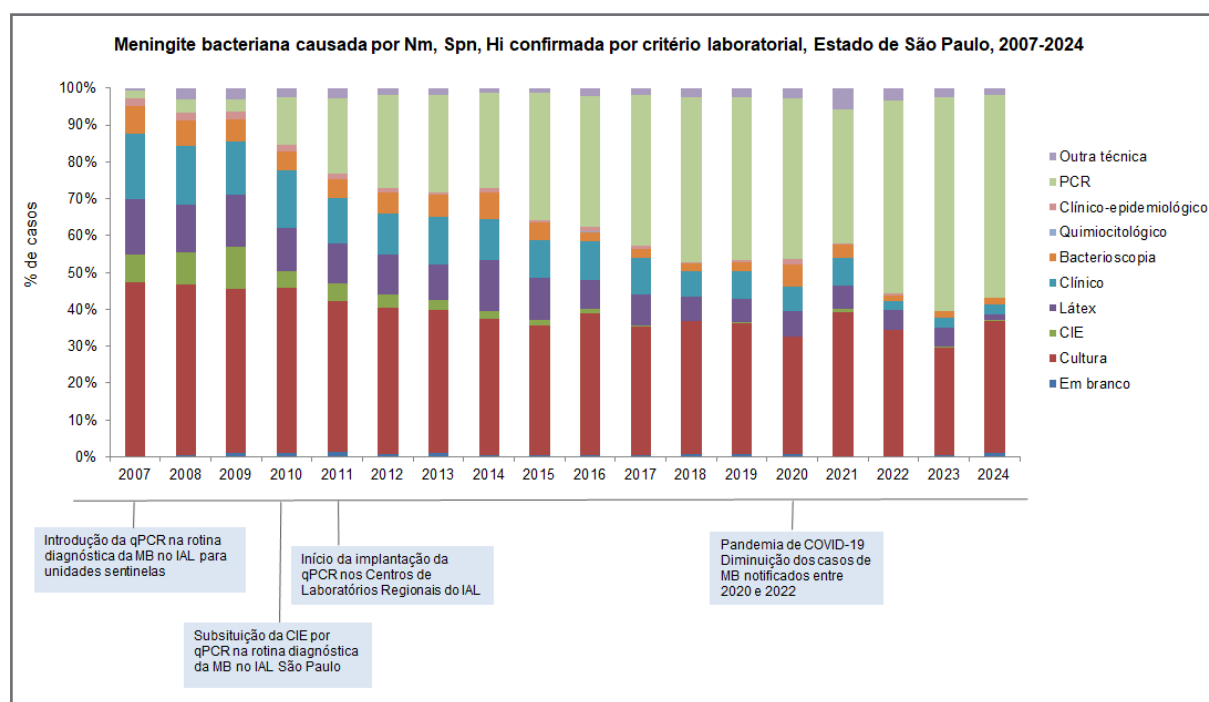
## Contribuição do uso de ensaios de qPCR para a vigilância laboratorial das MB

A incorporação dos ensaios de qPCR na rotina diagnóstica das MB proporcionou maior agilidade na liberação dos resultados, o que contribuiu para o estabelecimento de terapias adequadas aos pacientes, refletindo na redução das complicações, sequelas e letalidade da doença, além de diminuição de custos referentes a tratamento e hospitalização. Desde a implantação dos ensaios de qPCR na rotina diagnóstica das MB, foram processadas pelo IAL-São Paulo, aproximadamente, 38.000 amostras clínicas de pacientes com suspeita da doença.

Adicionalmente, o uso da qPCR possibilitou agilizar as ações da vigilância epidemiológica no controle de surtos de doença meningocócica, possibilitando a interrupção da sua cadeia de transmissão em uma região ou comunidade. Pela rapidez na liberação dos resultados, a qPCR foi utilizada na investigação de diversos surtos comunitários identificando o meningococo e genogrupo envolvido, possibilitando a implantação de medidas de controle por meio de quimioprofilaxia e/ou vacinação.<sup>31,32,33</sup> Os ensaios de qPCR também foram utilizados na confirmação laboratorial de casos de doença meningocócica por sorogrupo X que ocorreram no país durante a pandemia de covid-19.<sup>34</sup>

Os dados do DATASUS revelam que, a partir de 2010, ano em que os ensaios de qPCR substituíram a CIE na rotina diagnóstica das MB no IAL, houve aumento na confirmação laboratorial de casos de MB no estado de São Paulo pela técnica de PCR (Figura 2).

**Figura 2.** Casos de meningite bacteriana causados por *Neisseria meningitidis* (Nm), *Streptococcus pneumoniae* (Spn) ou *Haemophilus influenzae* (Hi) confirmados por critérios laboratoriais no estado de São Paulo, de 2007 a 2024.



Fonte de dados: DATASUS. Tecnologia da informação a serviço do SUS. Meningite – casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação. Dados de 2024, atualizados em 28/6/2024 e sujeitos a revisão.

Nm: *Neisseria meningitidis*, Spn: *Streptococcus pneumoniae*, Hi: *Haemophilus influenzae*, qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real; MB: meningite bacteriana; IAL: Instituto Adolfo Lutz; CIE: contraimuno eletroforese.

Entre 2010 e 2024, a PCR foi responsável pela confirmação laboratorial de 27%, 38% e 44% dos casos de meningite causados por Nm, Spn e Hi, respectivamente.<sup>1</sup> Entretanto, vale ressaltar que o DATASUS compila os dados de casos confirmados por PCR de todas as unidades de saúde, públicas ou privadas, sem distinção do ensaio, de *kit* comercial ou ensaio *in house*, não sendo possível afirmar quantos casos foram confirmados com uso dos



ensaios de qPCR estabelecidos pelo IAL. De qualquer forma, o uso da metodologia de PCR tem se mostrado uma ferramenta valiosa na confirmação de casos de MB, principalmente em situações nas quais há falha da cultura bacteriana, em decorrência da administração de antibióticos anterior à coleta da amostra clínica ou de conservação e/ou transporte inadequado do material biológico.

## Outras contribuições

### Produção de controles genéticos

Com o repasse dos ensaios de qPCR para Lacen e CLR houve aumento da demanda por controles positivos fornecidos pelo IAL, que eram constituídos de suspensões bacterianas inativadas de cepas-padrão de Nm, Spn ou Hi. Além dos riscos biológicos associados à manipulação de bactérias altamente infectantes, essas suspensões bacterianas apresentavam baixa estabilidade nos ensaios de qPCR, necessitando de trocas semanais ou mensais dos lotes desses controles. Assim, nosso grupo desenvolveu controles genéticos específicos constituídos de plasmídeos contendo os alvos das reações de qPCR para Nm, Spn, Hi, RP e genogrupos A, B, C, W, Y, X. O uso desses controles possibilitou a melhora da qualidade dos ensaios de qPCR pela maior estabilidade e reprodutibilidade em relação aos controles de suspensões bacterianas. Além disso, por serem liofilizados, os controles genéticos podem ser facilmente transportados e armazenados em temperatura ambiente, possibilitando sua ampla utilização por diferentes laboratórios de saúde pública. [35,36](#)

### Avaliação do uso de cartões de papel de filtro para transporte de amostras biológicas

Com a descentralização, houve maior acesso aos ensaios de qPCR por pacientes atendidos em unidades hospitalares distantes das grandes cidades, onde geralmente se encontram os Lacen ou CLR, tornando o transporte e acondicionamento adequado de materiais clínicos um fator crucial para a realização da qPCR com qualidade e confiabilidade. Pensando nesse problema, nosso grupo avaliou o uso de cartões de papel de filtro para impregnar amostras de LCR e soro de pacientes com suspeita de MB para análise nos ensaios de qPCR. A sensibilidade da m<sub>q</sub>PCR na detecção de Nm, Spn ou Hi empregando LCR ou soro impregnado em cartões de papel de filtro foi de 92-100% e 73-100%, respectivamente. Por ser transportado em temperatura ambiente, o cartão de papel de filtro facilita o encaminhamento de amostras clínicas para laboratórios de referência para realização dos ensaios de qPCR, representando uma alternativa rápida, viável e econômica de transporte de materiais entre laboratórios. [37](#)

## Avaliação de kits comerciais

Nos últimos anos, kits comerciais baseados em m<sub>q</sub>PCR foram registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e disponibilizados no mercado. Apesar do ensaio *in house* apresentar melhor custo-benefício em relação aos kits comerciais, pode haver dificuldades na disponibilidade de todos os reagentes que devem ser adquiridos separadamente. Assim, o uso de kits facilita o processo licitatório de compras pelo serviço público, garantindo a manutenção do diagnóstico laboratorial das MB. Para subsidiar aquisições pelos laboratórios públicos, nosso grupo, em colaboração com a CGLAB/MS, realizou um estudo comparativo para avaliar o desempenho de três kits comerciais registrados no país. Nossos dados mostraram que todos os kits provaram ser competentes na detecção qualitativa de Nm, Spn e Hi, em comparação ao ensaio de m<sub>q</sub>PCR *in house*, mas apenas um kit é validado para uso em ambas amostras de LCR e soro.<sup>38</sup>

## Considerações finais

Ao longo de quinze anos de uso dos ensaios de qPCR na rotina diagnóstica das MB, algumas modificações no ensaio foram realizadas de acordo com a disponibilidade de novos alvos genéticos, equipamentos e reagentes. Visando ao aprimoramento do ensaio de qPCR, testamos diferentes alvos genéticos, dos quais foram selecionados os que apresentaram melhor cobertura de genogrupos/genotipos e de especificidade para Nm, Spn ou Hi dentro dos tipos de material biológico coletado em casos de MB. Com aumento da variedade de equipamentos e/ou de reagentes para qPCR ofertados no mercado, foi necessário adequar os ensaios de qPCR de acordo com a sua disponibilidade, sem perda dos parâmetros analíticos do ensaio.

Há duas décadas, a metodologia de qPCR começava a ser introduzida no país, com restrita disponibilidade de reagentes e equipamentos, limitando seu uso de forma rotineira nos laboratórios públicos. No cenário atual, alavancado pelas pandemias de Influenza A (H1N1) e de covid-19, dispomos de grande variedade de reagentes, equipamentos, kits comerciais e plataformas automatizadas que propiciam o processamento de milhares de amostras clínicas com rapidez e confiabilidade. Apesar da disponibilidade de novas tecnologias, como o sequenciamento de nova geração<sup>7,39</sup> ou testes síndromicos como Filmarray,<sup>7,40</sup> consideramos que os ensaios de qPCR ainda serão utilizados por muitos anos nos laboratórios públicos pelo custo-efetividade, possibilitando amplo acesso ao diagnóstico das MB em todos os níveis de cuidado do paciente.

## Referências

1. DATASUS. Tecnologia da informação a serviço do SUS. Meningite – casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação – Brasil. 2024 [acesso em 20 de setembro 2024]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinannet/cnv/meninbr.def>
2. Organização Pan-Americana de Saúde. OMS e parceiros pedem ação urgente contra meningite. 2021 [acesso em 10 de setembro 2024]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/28-9-2021-oms-e-parceiros-pedem-acao-urgente-contra-meningite>
3. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac. Meningites. Dados estatísticos. 2024 [acesso em 20 de setembro 2024]. Disponível em: <https://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/agravos/meningites>
4. World Health Organization. WHO Manual. Laboratory Methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. 2 ed. Geneva: WHO Press; 2011. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EDC\\_99.7.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_CDS_CSR_EDC_99.7.pdf)
5. Salgado MM, Gonçalves MG, Fukasawa LO, Higa FT, Paulino JT, Sacchi CT. Evolution of bacterial meningitis diagnosis in Sao Paulo State-Brazil and future challenges. Arq Neuropsiquiatr. 2013; 71(9B):672-6. doi: <http://doi.org/10.1590/0004-282X20130148>.
6. Brouwer MC, Thwaites GE, Tunkel AR, van de Beek D. Dilemmas in the diagnosis of acute community-acquired bacterial meningitis. Lancet. 2012; 380(9854):1684-92. doi: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61185-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61185-4).
7. Diallo K, Feteih VF, Ibe L, Antonio M, Caugant DA, du Plessis M, et al. Molecular diagnostic assays for the detection of common bacterial meningitis pathogens: A narrative review. EBioMedicine. 2021; 65:103274. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103274>.
8. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB. 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. doi: <http://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1553-1558.2001>.
9. 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. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0020675>.
10. Instituto Adolfo Lutz, Seção de Imunologia. Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz. BEPA. 2007; 4(40):24-7.
11. Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Araújo TP, Custódio AV, Harrison LH, et al. Utilização da PCR em tempo real para o diagnóstico laboratorial rápido das meningites bacterianas. In: Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia; 8-12 nov 2009; Porto de Galinhas, PE. Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2009.

12. Thomas JD, Hatcher CP, Satterfield DA, Theodore MJ, Bach MC, Linscott KB, et al. *sodC*-based real-time PCR for detection of *Neisseria meningitidis*. PLoS One. 2011; 6(5):e19361. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0019361>.
13. Higa FT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Lemos APS, Harrison LH, et al. Use of *sodC* versus *ctrA* for real-time polymerase chain reaction-based detection of *Neisseria meningitidis* in sterile body fluids. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(2):246-7. doi: <http://doi.org/10.1590/0074-0276108022013020>.
14. Weckx LY, Puccini RF, Machado A, Gonçalves MG, Tuboi S, Barros E, et al. A cross-sectional study assessing the pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in subjects aged 1-24 years in the city of Embu das Artes, São Paulo, Brazil. Braz J Infect Dis. 2017; 21(6):587-95. doi: <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.06.005>.
15. Moraes JC, Kemp B, Lemos AP, Gorla MCO, Marques EGL, Ferreira MC, et al. Prevalence, Risk Factors and Molecular Characteristics of Meningococcal Carriage Among Brazilian Adolescents. Pediatr Infect Dis J. 2015; 34(11):1197-202. doi: <http://doi.org/10.1097/INF.0000000000000853>.
16. Sáfyadi MA, Carvalhanas TR, Paula de Lemos A, Gorla MC, Salgado M, Fukasawa LO, et al. Carriage rate and effects of vaccination after outbreaks of serogroup C meningococcal disease, Brazil, 2010. Emerg Infect Dis. 2014; 20(5):806-11. doi: <http://doi.org/10.3201/eid2005.130948>.
17. Almeida SCG, Fukasawa LO, Brandão AP, Salgado MM, Leite D, Brandileone MCC, et al. Importância dos genes *ply* e *lytA* na detecção molecular de *Streptococcus pneumoniae* por PCR em tempo real. In: Anais do I Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica; 16-19 set 2008; Gramado, RS. Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2008.
18. Sam IC, Smith M. Failure to detect capsule gene *bexA* in *Haemophilus influenzae* types e and f by real-time PCR due to sequence variation within probe binding sites. J Med Microbiol. 2005; 54(Pt5):453-5. doi: <http://doi.org/10.1099/jmm.0.45836-0>.
19. Zanella RC, Bokerman 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. doi: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.053>.
20. Wang X, Mair R, Hatcher C, Theodore MJ, Edmond K, Wu 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. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.11.004>.
21. Salgado MM, Higa FT, Gonçalves MG, Fukasawa LO, Liphhaus BL, Oliveira PL, et al. Nova versão do ensaio de PCR em tempo real para o diagnóstico laboratorial e vigilância epidemiológica das meningites bacterianas. BEPA. 2012; 9(103):16-20.
22. Gonçalves MG, Higa FH, Fukasawa LO, Barros LDA, Salgado MM. Evolução na vigilância laboratorial do *Haemophilus influenzae* nas meningites e pneumonias bacterianas, por PCR em tempo real, no Estado de São Paulo (2010-2019). BEPA. 2022; 19:1-16. doi: <https://doi.org/10.57148/bepa.2022.v.19.37293>.
23. 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; 10(2):311-6. doi: <http://doi.org/10.3201/eid1002.030759>.

24. 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. doi: <http://doi.org/10.1128/JCM.06087-11>.
25. Maaroufi Y, Bruyne JM, Heymans C, Crokaert F. Real-time PCR for determining capsular serotypes of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(7):2305-8. doi: <http://doi.org/10.1128/JCM.00102-07>.
26. Marasini D, Whaley MJ, Jenkins LT, Hu F, Jiang W, Topaz N, et al. Direct real-time PCR for the detection and serotyping of *Haemophilus influenzae* without DNA extraction. *J Clin Microbiol.* 2022; 60(4):e0211121. doi: <http://doi.org/10.1128/jcm.02111-21>.
27. Pimenta FC, Roundtree A, Soysal A, Bakir M, du Plessis M, Wolter N, et al. Sequential triplex real-time PCR assay for detecting 21 pneumococcal capsular serotypes that account for a high global disease burden. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(2):647-52. doi: <http://doi.org/10.1128/JCM.02927-12>.
28. Velusamy S, Tran T, Mongkolrattanothai T, Walker H, McGee L, Beall B. Expanded sequential quadriplex real-time polymerase chain reaction (PCR) for identifying pneumococcal serotypes, penicillin susceptibility, and resistance markers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020; 97(2):115037. doi:<http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115037>.
29. Zanella RC, Brandileone MCC, Almeida SCG, Lemos APS, Sacchi CT, Gonçalves CR, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Staphylococcus aureus* in a Brazilian elderly cohort. *PLoS One.* 2019; 14(8):e0221525. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0221525>.
30. Brandileone MC, Zanella RC, Almeida SCG, Cassiolato AP, Lemos APS, Salgado MM, et al. Long-term effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in children in Brazil. *Vaccine.* 2019; 37(36):5357-63. doi: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.043>.
31. Liphaut BL, Okai MICG, Lemos APS, Gorla MC, Fernandes MR, Pacola MR, et al. Outbreak of *Neisseria meningitidis* C in a Brazilian oil refinery involving an adjacent community. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31(2):88-92. doi: <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.05.009>.
32. Iser BPM, Lima HCAV, Moraes C, Almeida RPA, Watanabe LT, Alves SLA, et al. Outbreak of *Neisseria meningitidis* C in workers at a large food-processing plant in Brazil: challenges of controlling disease spread to the larger community *Epidemiol Infect.* 2012; 140(5):906-15. doi: <http://doi.org/10.1017/S0950268811001610>.
33. Fernandes RMBP, Doro CM, Reis R, Silva APM, Souza DF, Barbosa HA, et al. Doença meningocócica: investigação de surto comunitário no Distrito Administrativo do Ipiranga, município de São Paulo, julho de 2007. *BEPA.* 2007; 4(44): 10-7.
34. Fukasawa LO, Liphaut BL, Gonçalves MG, Higa FT, Camargo CH, Carvalhanas TRMP, et al. Invasive Meningococcal X Disease during the COVID-19 Pandemic, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2022; 28(9):1931-2. doi: <http://doi.org/10.3201/eid2809.220531>.
35. Fukasawa LO, Sato NS, Sacchi CT. Construction of plasmids for use in real time PCR assays for the multiplex detection of bacterial meningitis pathogens. In: *Anais do 5º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica*; 13-15 mai 2016; São Pedro, SP. Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2016.

36. Fukasawa LO, Sato NS, Sacchi CT. Construção de controles genéticos para melhoria da qualidade dos ensaios de PCR em tempo real para o diagnóstico de meningite bacteriana. *Revista O Biológico*. 2016; 78(2).
37. Fukasawa LO, Gonçalves MG, Higa FT, Castilho EA, Ibarz-Pavón AB, Sacchi CT. Use of cerebrospinal fluid and serum samples impregnated on FTA™ Elute filter paper for the diagnosis of infections caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *PLoS One*. 2017; 12(2):e0172794. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0172794>.
38. 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*. 2023; 20:e39209. doi: <https://doi.org/10.57148/bepa.2023.v.20.39209>
39. Long JR, Mitchell K, Edwards J, Wroblewski D, Luke E, Dickinson M, et al. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis by direct detection, serotyping and Next Generation Sequencing: How 10 years of testing in New York State has evolved to improve laboratory diagnosis and public health. *Mol Cell Probes*. 2022; 61:101786. doi: <http://doi.org/10.1016/j.mcp.2021.101786>.
40. Côrtes LGF, Maldonado MM, Koga PCM, Santiago KAS, Fernandes GBP, Maluf MM, et al. Evaluation of pathogen from the FilmArray meningitis/encephalitis panel and recommendations on atypical findings *Arq Neuropsiquiatr*. 2024; 82(1):1-8. doi: <http://doi.org/10.1055/s-0044-1779035>.

## Contribuição dos autores

Concepção da pesquisa: LOF; análise e interpretação dos dados: LOF, MGG, FTH; redação e revisão crítica do manuscrito: LOF, MGG, FTH, MMS, CTS; aprovação da versão a ser publicada: LOF, MGG, FTH, MMS, CTS.

## Preprint

O manuscrito não foi previamente publicado em servidores preprint.

## Aprovação dos autores

Todos os autores participaram efetivamente do trabalho, aprovam a versão final do manuscrito para publicação e assumem total responsabilidade por todos os seus aspectos, garantindo que as informações sejam precisas e confiáveis.

## Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesse de natureza política, comercial e financeira no manuscrito.

## Financiamento

Os autores declaram que não houve fontes de financiamento.

## Agradecimento

Os autores agradecem à Diretoria Geral do Instituto Adolfo Lutz, ao Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, à Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública do Ministério da Saúde (CGLAB/MS), à Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória do Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac e aos profissionais Alonso Fernandes, Vanessa Cristina Barbosa e Terezinha Pereira de Araújo Oliveira pela assistência técnica na rotina diagnóstica das MB.