



# Avaliação do desempenho da PCR em tempo real para o diagnóstico de meningite por *Enterovirus*

## Evaluation of a real-time PCR assay performance for the diagnosis of enteroviral meningitis

[RIALA6/1695](#)

Bráulio Caetano MACHADO\*, Heloísa Rosa VIEIRA, Mayara Rhaissa de Moraes ALVES, Rita de Cássia Compagnoli CARMONA

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2909. E-mail: bcmachado@ial.sp.gov.br

Recebido: 27.08.2015 - Aceito para publicação: 08.04.2016

### RESUMO

O gênero *Enterovirus* (EV) é o agente etiológico mais frequente e responsável pela ocorrência de meningite viral no mundo. O objetivo deste trabalho foi de avaliar resultados da implantação do ensaio de PCR em tempo real (RT-qPCR) para a detecção de EV. Foram selecionadas 616 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com meningite, recebidas para realizar diagnóstico laboratorial no período de 1998-2013. Os RNAs foram extraídos diretamente do LCR pelo método QIAamp®, e o ensaio TaqMan® foi aplicado. A avaliação foi feita comparando-se resultados de RT-qPCR com os obtidos pelo método de isolamento em cultura de células. Das 616 amostras analisadas, 94 (15,2 %) foram positivas para EV no ensaio de RT-qPCR; e na cultura celular EV foi isolado de 58 (9,4 %) amostras. Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram de 89,70 %, 92,40 %, 55,30 % e 98,90 %, respectivamente. O RT-qPCR foi ligeiramente superior à cultura viral para a detecção de EV no LCR. O RT-qPCR TaqMan® é um ensaio rápido e sensível, facilmente executável e com potencial para melhorar o diagnóstico da meningite viral na rotina do laboratório de saúde pública no Estado de São Paulo.

**Palavras-chave.** infecções por *Enterovirus*, meningite, PCR em tempo real.

### ABSTRACT

*Enterovirus* (EV) genus is the most frequent etiological agent causing viral meningitis worldwide. This study aimed at evaluating the performance of real-time reverse transcription-PCR (RT-qPCR) assay for detecting EV. A total of 616 cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with meningitis were selected, among those received at EV diagnosis laboratory from 1998 to 2013. RNAs were directly extracted from CSF by using QIAamp® Viral RNA Mini Kit, and TaqMan® RT-qPCR assay was applied. Evaluation was made by comparing the RT-qPCR results with those found in the cell culture for viral isolation method. Of 616 analyzed samples, 94 (15.20%) were positive for EV RNA on the RT-qPCR assay; and in the cell culture EV was isolated from 58 (9.40 %) samples. The assay showed sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of 89.70 %, 92.40 %, 55.30 % and 98.90 %, respectively. In the present study, the RT-qPCR assay was slightly superior when compared to the viral culture technique for detecting EV from CSF samples. The TaqMan® RT-qPCR assay shows to be a fast and sensitive assay, easy to perform, and it shows a potential to improve the viral meningitis diagnosis in the public health laboratory in São Paulo State.

**Keywords.** enterovirus infections, meningitis, real time PCR.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Enterovirus* (EV) pertence à família Picornaviridae e é composto por mais de 100 sorotipos virais, e em sua maioria são patógenos humanos<sup>1</sup>. A maior parte das infecções por EV é assintomática ou resulta em doença branda, como febre inespecífica leve ou sintomas respiratórios não específicos<sup>2</sup>. Os EVs são pequenos no tamanho (aproximadamente 30 nm), não envelopados, e possui RNA de fita simples e polaridade positiva. O RNA dos EVs é de aproximadamente 7,5 kb. A região codificante é delimitada pelas regiões não traduzidas nas extremidades 5' e 3'<sup>2</sup>. Apesar de baixa taxa de letalidade em comparação com a meningite bacteriana, a meningite viral apresenta caráter cosmopolita e representa significativa causa de morbidade, principalmente em crianças, sem distinção por sexo, e pode provocar sequelas neurológicas; e em caso de agravamento da doença pode levar o paciente à morte. Os EVs podem ocorrer isoladamente e causar infecção, embora seja comum o aglomerado de infectados em ocasionar surtos<sup>2</sup>. Estes vírus são a causa mais comum de meningite asséptica em crianças e adultos, e estão diretamente associados a 80,00 a 90,00 % dos infectados<sup>3</sup>. O diagnóstico rápido e acurado das infecções por EV pode reduzir o uso indiscriminado de antibióticos durante a hospitalização, bem como o seu custo financeiro<sup>4</sup>. A implementação de métodos rápidos para o diagnóstico da meningite por EV tornou-se um requisito muito importante para os serviços de Saúde Pública, porque com esse instrumento é possível fornecer rapidamente os resultados para os clínicos, e proporcionar melhor assistência aos pacientes<sup>5</sup>. Os métodos laboratoriais de rotina diagnóstica utilizando-se o ensaio de PCR em tempo real (RT-qPCR) têm sido desenvolvidos nos últimos 15 anos. Em virtude de seu alto grau de conservação, a região 5' não traduzida do genoma viral é largamente utilizada nos métodos de detecção dos EVs<sup>5</sup>. Tem sido também desenvolvido com êxito a técnica de RT-qPCR para efetuar a detecção direta do agente patogênico em vários tipos de materiais clínicos, como o LCR<sup>6</sup>. Outros métodos de detecção como a plataforma "GeneXpert Enterovírus" têm sido empregados e que demonstram bons resultados, porém o alto

custo inviabiliza a sua utilização em larga escala<sup>7</sup>. Outrossim, tem sido frequentemente relatada a utilização da reação de RT-qPCR em um formato combinado, em que por meio de um único ensaio realiza-se a detecção simultânea de outros agentes virais (ex: Enterovírus e Parechovirus). Esses avanços tecnológicos facilitam o aprimoramento do diagnóstico de meningite<sup>8</sup>. O objetivo deste trabalho foi de avaliar os resultados da implantação do ensaio de PCR em tempo real para a detecção de EV, tendo como alvo a região 5' não traduzida, na análise de amostras de LCR para efetuar o diagnóstico laboratorial de indivíduos com suspeita de meningite viral.

## MATERIAL E MÉTODOS

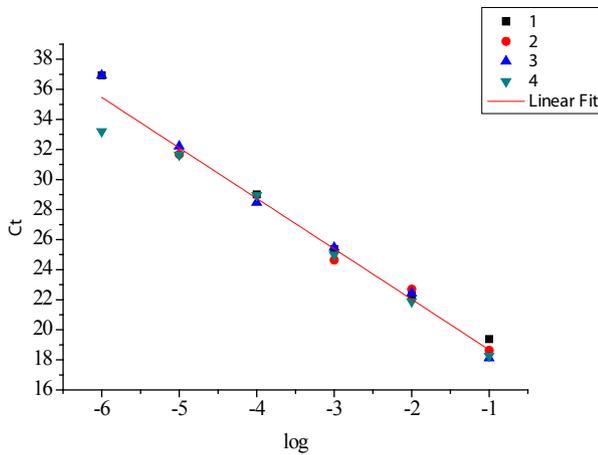
Para o processo de padronização do ensaio foi utilizada a cepa de vírus padrão do laboratório - echovírus 30 (E-30), que após a titulação o RNA foi extraído utilizando-se o *kit* QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha). Foi preparada a diluição seriada decimal da suspensão de EV para avaliar a eficiência, a sensibilidade analítica e a repetitividade do ensaio de RT-qPCR; e os parâmetros obtidos foram empregados para fazer os ajustes necessários para otimização da técnica. Para esta finalidade, inicialmente foram obtidos os títulos de infectividade da cepa padrão E-30. A estimativa de infectividade do sobrenadante de E-30 foi determinada por microtitulação em células RD (Rabdomiossarcoma humano - CCIAL 039 - Instituto Nacional de Virologia do México). Os títulos infectantes do vírus foram calculados pelo método de Karber<sup>9</sup> e expresso em  $10^{-6,75}$  DICC<sub>50</sub> (dose infectante de cultura de células 50 %) por 100 mL. As diluições da cepa E-30 foram armazenadas a -70 °C para o preparo da extração de RNA. Para determinar o alcance e o limite de detecção do ensaio de RT-qPCR para EV, as diluições seriadas do RNA (de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) de cepa E-30 e as amostras de controle negativo foram testadas em quadruplicatas. Foi realizada uma reação para analisar a eficiência baseada na relação do "Cycle threshold, Ct" com a quantidade estimada de título de vírus em cada ponto da curva padrão. O gráfico gerado pela concentração

de amplicons e os respectivos valores de “Ct” foram empregados para realizar o cálculo da equação de regressão e a correlação entre as variáveis pelo R-quadrado (R<sup>2</sup>). O cálculo foi efetuado por meio do *software* do equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems®). Para avaliar a precisão do ensaio foi realizado o teste de repetitividade com 24 réplicas consecutivas dos títulos do RNA E-30 das diluições seriadas que apresentaram os valores de “Ct” ideais. Para o processo de validação do ensaio, foram selecionadas 616 amostras de LCR de pacientes com meningite, enviadas para o Núcleo de Doenças Entéricas do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz para o diagnóstico de EV entre os anos de 1998 e 2013. Essas amostras foram armazenadas em *freezer* a -70 °C, e o RNA foi extraído diretamente do LCR utilizando-se o *kit* QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. Foi utilizado o sistema “TaqMan® RT-qPCR assay” para efetuar o ensaio RT-qPCR. A avaliação do ensaio foi realizada comparando-se os resultados do RT-qPCR com os dados previamente obtidos pela técnica de isolamento viral em cultura de células que é considerado a metodologia “Padrão Ouro”. O RNA extraído foi estocado em *freezer* a -70 °C. A reação de RT-qPCR foi realizada empregando-se os *primers* para o gênero EV, que apresentam a região conservada 5’ não traduzida dos EVs (5’NTR) como alvo de detecção. Foram utilizados: *primer* senso 5’-CCCTGAATGCGGCTAATCC-3’, *primer* anti-senso 5’-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3’ e *probe* FAM 5’-AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-3’ BHQ, conforme a descrição prévia com pequenas modificações<sup>10</sup>. As concentrações dos componentes da reação foram 300 nM (*primer* senso), 900 nM (*primer* anti-senso), 150 nM (*probe*), 1x *kit* “SuperScript™ III One-step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase Invitrogen” (Life Technologies Carlsbad, CA, EUA) e 5 µL do RNA viral extraído, resultando no volume total de 25 µL. Como controle de qualidade da extração do RNA viral foram utilizados em reação separada, os *primers* (senso 5’-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3

na concentração de 40 nM) e anti-senso 5’-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3’ na concentração de 40 nM) e *probe* (FAM 5’-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-3’ BHQ na concentração de 10 nM) que têm como alvo de detecção a Ribonuclease P (Rnase P, RP) do gene RP humano. Esta reação ao resultar em curva de amplificação, indica a presença suficiente de RNA humano e confirma que a amostra apresenta boa qualidade. Os controles positivos e negativos foram utilizados na reação. Para a validação do teste, foram também incluídas as amostras sabidamente negativas e amostras sabidamente positivas para Enterovírus com cargas virais distintas, bem como de outros agentes virais (herpes1, citomegalovírus, Epstein Barr, rubéola, encefalite Saint Louis, Rocio) para verificar a ocorrência de reações cruzadas. As amostras foram colocadas na placa em duplicata e a reação foi processada no aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A transcrição reversa mediada pela enzima “SuperScript™ III” foi realizada a 50 °C durante 15 min, seguida de ativação da enzima Platinum® Taq DNA polimerase a 95 °C durante 2 min e, posteriormente, por 45 ciclos combinando-se desnaturação a 95 °C por 15 segundos, e anelamento e extensão a 60 °C durante 1 min. Os resultados de fluorescência da reação foram coletados em cada etapa de anelamento e extensão, e os dados foram analisados ao final da corrida utilizando-se o *software* ABI 7500 SDS versão 1.7.1. Foram estimados os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, prevalência, prevalência estimada, acurácia e classificação incorreta. A concordância dos resultados de positividade apresentada pelos ensaios foi avaliada pelo índice *Kappa*<sup>11</sup>. A pesquisa foi conduzida conforme as recomendações das resoluções vigentes no período de estudo. Inicialmente, a Resolução 196 de 10 de outubro de 1996; posteriormente, seguiu-se a Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional da Saúde - Ministério da Saúde. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz/SP, segundo o protocolo nº 031/2010-IAL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A equação de regressão obtida no presente estudo mostrou boas condições de amplificação (valor de inclinação de -3,3) e correlação positiva entre as variáveis (coeficiente de determinação  $R^2$ ) de 0,98 e o valor de  $\gamma$ -intercepto foi de 20,83 observada nas diluições sucessivas. Na análise destes dados gerados na curva padrão, foi observada eficiência de amplificação de 99,80 %. A curva padrão de eficiência do ensaio de RT-qPCR está apresentada na **Figura 1**. O teste de repetitividade resultou nos respectivos valores de média (Ct), variância e desvio padrão: réplicas  $10^{-3}$  (22,51; 0,005; 0,07) e réplicas  $10^{-4}$  (25,94; 0,03; 0,17) considerados adequados, e que não suscitam potenciais problemas de precisão. O gênero EV foi detectado em 94 (15,20 %) de 616 amostras analisadas por meio de ensaio RT-qPCR e foi isolado de 58 (9,40 %) das 616 mostras na cultura celular. O ensaio RT-qPCR apresentou valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo de 89,70 %; 92,40 %; 55,30 %; 98,90 %; respectivamente. A acurácia foi de 92,20 % e a classificação incorreta foi de 7,80 %. O isolamento em cultura de células e RT-qPCR mostra o valor de *Kappa* de 0,78, o que indica boa concordância (**Tabela 1**). No presente estudo, o ensaio de RT-qPCR foi superior à técnica de cultura celular para detectar EV em



**Figura 1.** Curva padrão de eficiência do ensaio de RT-qPCR analisado no equipamento ABI7500, utilizando-se como alvo o antígeno padrão E-30

amostras de LCR. A qualidade do RNA extraído pode influir significativamente na sensibilidade do teste<sup>12</sup>.

Durante o processo de avaliação dos resultados notou-se que ao estratificar os resultados por grupos de idade, houve aumento da sensibilidade do teste. Neste contexto, os valores de sensibilidade foram de 95,20 % ao analisar as amostras de crianças de 0 a 5 anos de idade, e de 93,10 % nas amostras da faixa etária de 5 a 15 anos de idade (**Tabela 2**). Portanto, foi evidenciada uma questão que foi investigada pela análise de três amostras positivas no isolamento em cultura celular, porém negativas na reação de RT-qPCR. Estas amostras foram coletadas de pacientes de maior faixa etária ( $\geq 15$  anos), em que a sensibilidade do teste foi apenas de 62,50 % (das oito amostras positivas na cultura celular, cinco foram positivas na reação de RT-qPCR). A ocorrência dessas três amostras discordantes interferiu na avaliação da técnica e causou diminuição da sensibilidade do teste para

**Tabela 1.** a) Comparação entre os resultados das amostras processadas utilizando-se as técnicas de Isolamento em Culturas de Células (método padrão ouro) e PCR em tempo real para o gênero EV. b) Parâmetros avaliados no processo de validação e os resultados obtidos

a)		Padrão Ouro		
		Isolamento em Cultura de Células		
		Positivo	Negativo	Total
Ensaio de rRT-PCR	Positivo	52	42	94
	Negativo	6	516	522
	Total	58	558	616
b)		Avaliação rRT-PCR		
Sensibilidade		89,70 %		(52/58)
Especificidade		92,40 %		(516/558)
Prevalência (real)		9,40 %		(58/616)
Prevalência Estimada		15,20 %		(94/616)
Valor Preditivo Positivo		55,30 %		(52/94)
Valor Preditivo Negativo		98,90 %		(516/522)
Acurácia		92,20 %		(52+516/616)
Classificação Incorreta		7,80 %		(42+6/616)
Valor de <i>Kappa</i>		0,78		--

**Tabela 2.** Desempenho do RT-qPCR em relação ao Isolamento em Cultura de Células estratificado por faixas etárias dos pacientes

Amostra Clínica/LCR – RT-qPCR – Isolamento C. Celular			
Idade	Sensibilidade	Especificidade	Distribuição / idade
< 5 anos	95,20 % (20/21)	90,30 % (103/114)	135 (22,00 %)
entre 5 a 15 anos	93,10 % (27/29)	89,40 % (194/217)	246 (39,90 %)
> 15 anos	62,50 % (5/8)	96,40 % (219/227)	235 (38,10 %)
Total	89,70 % (52/58)	92,40 % (516/558)	616 (100,00 %)

89,70 %, apesar de este valor ser ainda considerado significativo. Alguns fatores podem influenciar na discordância dos resultados, como: a presença de inibidores no LCR (hemácias); a contaminação no manuseio da amostra no momento da execução da técnica; o tempo de armazenamento; os inúmeros procedimentos de congelamento e descongelamento das amostras clínicas.

Apesar de ter sido utilizado um grande número de amostras clínicas armazenadas há muitos anos no laboratório, o manuseio e os procedimentos técnicos executados nas extrações de RNA de todas as amostras selecionadas foram adequados, pois todas as reações demonstraram resultados válidos, evidenciado pela amplificação do alvo *primer* RP. No processo de validação não houve reação cruzada ou resultado falso positivo nos testes realizados com as amostras específicas sabidamente positivas e negativas e com os soros de pacientes infectados com outros agentes virais. O ensaio TaqMan® RT-qPCR é rápido e apresenta boa sensibilidade para efetuar a confirmação dos pacientes infectados por EV. Este ensaio é de fácil execução, que o torna como excelente alternativa para o isolamento em cultura de células, que é trabalhoso, exige prática do técnico envolvido e consome muito tempo. No futuro, outras modificações poderão aprimorar ainda mais o desempenho do ensaio, e com a possibilidade de padronizar RT-qPCR combinado. Deste modo, um único teste poderá executar a detecção simultânea de outros agentes virais responsáveis pela ocorrência de meningite, tornando-se mais

ágil a resposta para os serviços de saúde do Estado de São Paulo.

## CONCLUSÃO

O ensaio de RT-qPCR para EV foi padronizado e validado em termos de eficiência, sensibilidade e precisão linear para o gene avaliado, e apresenta rendimento suficiente para ser empregado no diagnóstico qualitativo. No presente estudo foram determinadas as melhores condições para a implantação do ensaio de RT-qPCR para EV na rotina diagnóstica do Núcleo de Doenças Entéricas do Instituto Adolfo Lutz. O ensaio de RT-qPCR realizado com amostras de LCR demonstrou boas sensibilidade e especificidade, e tem o potencial de contribuir substancialmente para a vigilância epidemiológica de doentes esporádicos e de surtos de meningite viral no Estado de São Paulo.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos o Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz pelo apoio no fornecimento das culturas celulares utilizadas, e aos demais membros da equipe do Núcleo de Doenças Entéricas pela assistência técnica prestada.

Apoio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Projeto 2012/50234-5

## PRÊMIO

O resumo com os dados preliminares deste estudo recebeu o prêmio “PASCV Travel Award 2015” e foi apresentado na forma de pôster no “31º Simpósio Anual da Sociedade Pan-Americana de Virologia Clínica” em Daytona Beach, Flórida nos Estados Unidos da América.

## REFERÊNCIAS

1. Knowles NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AM, Lindberg AM, Pallansch MA, et al. *Picornaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier; 2012.p.855-80.
2. Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: *Knipe DM, Howley PM. 4ª ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins; 2001.p.723-75.*
3. Abzug MJ. Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates. *Paediatr Drugs*. 2004;6(1):1-10. [DOI:10.2165/00148581-200406010-00001].
4. King RL, Lorch SA, Cohen DM, Hodinka RL, Cohn KA, Shah SS. Routine cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction testing reduces hospitalization and antibiotic use for infants 90 days of age or younger. *Pediatrics*. 2007;120(3):489-96. [DOI:10.1542/peds.2007-0252].
5. Romero JR. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123:1161-9. [DOI:10.1043/0003-998528-199929123<1161].
6. Nijhuis M, Van Maarseveen N, Schuurman R, Verkuijlen S, De Vos M, Hendriksen K, et al. Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(10):3666-70. [DOI:10.118/JCM-40.10.3666-3670.2002].
7. Pabbaraju K, Wong S, Wong AA, Tellier R. Detection of enteroviruses and parechoviruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. *Mol Cell Probes*. 2015;29(2):81-5. [DOI:10.1016/j.mcp.2015.02.001].
8. Giulieri SG, Chapuis-Taillard C, Manuel O, Hugli O, Pinget C, Wasserfallen JB, et al. Rapid detection of enterovirus in cerebrospinal fluid by a fully-automated PCR assay is associated with improved management of aseptic meningitis in adult patients. *J Clin Virol*. 2015;62:58-62. [DOI:10.1016/j.jcv.2014.11.001].
9. Hierholzer JC, Killington RA. Virus isolation and quantification. In: *Virology Methods Manual: Kangro HO, Mahy BWJ. London: Academic Press; 1996.p.24-45.*
10. Verstrepen WA, Bruynseels P, Mertens AH. Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Virol*. 2002;25:39-43. [DOI:10.1016/S1386-6532(02)00032-X].
11. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74. [DOI:10.2307/2529310].
12. Oberste MS, Peñaranda S, Rogers SL, Henderson E, Nix WA. Comparative evaluation of Taq Man real time PCR and Semi nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Clin Virol*. 2010;49(1):73-4. [DOI:10.1016/j.jcv.2010.06.022].