

Impacto do uso da reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico de meningite bacteriana em substituição a contraímunoeletroforese

Impact of using polymerase chain reaction for the diagnosis of bacterial meningitis in substitution for counterimmuno-electrophoresis

Mariana Brena de Souza¹, Daniela Rodrigues Colpas², Andréia Moreira dos Santos Carmo³, Ivana Barros de Campos^{4*}

¹Bióloga pelo Centro Universitário Fundação Santo André. Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional Santo André; ²Biomédica pela Universidade de Mogi das Cruzes. Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional Santo André; ³Doutora em Biosistemas pela Universidade Federal do ABC, UFABC. Instituto Adolfo Lutz - Centro de Laboratório Regional Santo André; ⁴Doutora em Ciências no programa de Biotecnologia pela Universidade de São Paulo. Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional Santo André

Resumo

Introdução: a meningite bacteriana é um grave problema de Saúde Pública mundial, tendo como principais agentes: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. A metodologia de diagnóstico empregada no Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional Santo André até o ano de 2011 era a contraímunoeletroforese (CIE), depois foi substituída pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), que apresenta maior sensibilidade. **Objetivo:** este trabalho objetivou comparar ambas as metodologias no período de 2009 a 2018, para avaliação do impacto da introdução da qPCR no diagnóstico das meningites bacterianas nos 7 municípios da região do ABC do Estado de São Paulo. **Metodologia:** foram avaliadas a quantidade total de exames realizados, a média mensal, a positividade no período, os municípios requisitantes e a prevalência das bactérias causadoras de meningite, no período de abril/2009 até dezembro/2018. **Resultados:** Foram 377 exames de CIE e 1305 de qPCR, com média anual de 230 exames em 2010-2013 e 130 exames em 2014-2018. Observou-se aumento da positividade entre as técnicas, 17,8% para CIE e 33,8% para qPCR. *N. meningitidis* foi responsável pela maioria dos casos entre 2011 e 2013, cerca de 61% dos casos positivos, enquanto que entre 2014 e 2018 foi *S. pneumoniae*, cerca de 53%. **Conclusão:** os resultados indicaram que a qPCR foi mais eficiente em detectar os agentes causadores de meningite bacteriana na região do que a técnica de CIE. Por fim, este trabalho suporta a implantação da metodologia de qPCR para diagnóstico de meningite em substituição de técnicas menos sensíveis.

Palavras-chave: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Meningites Bacterianas. Contraímunoeletroforese. *Streptococcus pneumoniae*. *Neisseria meningitidis*. *Haemophilus influenzae*.

Abstract

Introduction: bacterial meningitis is still a serious worldwide public health problem, and the main etiological agents are: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. The diagnostic methodology employed at the Adolfo Lutz Institute – Santo André Regional Laboratory Center until 2011 was the counterimmuno-electrophoresis (CIE), then it was replaced by the real-time polymerase chain reaction (qPCR), which is more sensitivity. **Objective:** this study aimed to compare both methodologies from 2009 to 2018 to evaluate the impact of the introduction of qPCR in the diagnosis of bacterial meningitis in the 7 cities of the ABC region of São Paulo State. **Methodology:** the total number of tests performed, the month average, the positivity in the period, the requesting cities and the prevalence of bacteria causing meningitis were evaluated from April/2009 to December/2018. **Results:** there were 377 CIE exams and 1305 qPCR exams, with an annual average of 230 exams in 2010-2013 and 130 exams in 2014-2018. There was an increase in positivity between the performed techniques, 17.8% for CIE and 33.8% for qPCR. *N. meningitidis* accounted for most cases of bacterial meningitis between 2011 and 2013, about 61% of positive cases, whereas between 2014 and 2018 it was *S. pneumoniae*, with about 53%. **Conclusion:** the results indicated that qPCR was more efficient in detecting the agents that cause bacterial meningitis in the region than the CIE technique. Finally, this work supports the implementation of qPCR methodology for diagnosis of meningitis in replacement of less sensitive techniques.

Keywords: Real-Time Polymerase Chain Reaction. Meningitis, Bacterial. Counterimmuno-electrophoresis. *Streptococcus pneumoniae*. *Neisseria meningitidis*. *Haemophilus influenzae*

INTRODUÇÃO

A meningite é caracterizada por processo inflamatório

nas membranas que envolvem o cérebro e a medula espinhal e que pode ter diferentes agentes causais, como vírus, bactérias, fungos e parasitas.¹ A meningite bacteriana tem como principais agentes etiológicos: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*; que são bactérias que normalmente habitam a

Correspondente/Corresponding: *Ivana Barros de Campos – End: Avenida Ramiro Colleoni, 240, Santo André – SP. CEP: 09040-160 – Tel: (11) 4990-1267 – E-mail: ivanacamp@gmail.com

nasofaringe de indivíduos de maneira assintomática, sendo estes o reservatório para posterior disseminação a indivíduos mais suscetíveis a doença.² A meningite ainda hoje tem uma quantidade substancial de casos de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Sequelas neurológicas podem abranger problemas como perda auditiva ou no desenvolvimento neuropsíquico, e podem ocorrer em 50% dos sobreviventes.³

No Brasil, entre os anos de 2000 a 2010, foram confirmados laboratorialmente 110.264 casos de meningite bacteriana, destes 31,7% referiam-se a *N. meningitidis*, 12% a *S. pneumoniae* e 2% a *H. influenzae*.⁴ O diagnóstico laboratorial se dá a partir de amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR) pela realização dos exames quimiocitológico, da bacterioscopia, da cultura, sendo esta a técnica padrão ouro, a prova de aglutinação pelo látex e a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).⁵ O diagnóstico laboratorial é importante pois pode identificar o agente etiológico, beneficiando assim o paciente, que poderá ter o tratamento mais apropriado contra o agente causador, bem como a sociedade, pois orientará as medidas de controle e prevenção a serem adotadas.⁵ O Instituto Adolfo Lutz (IAL), que é um laboratório de referência nacional, faz o diagnóstico das meningites bacterianas para fins epidemiológicos. No Centro de Laboratório Regional Santo André (CLR Santo André) do IAL, até o ano de 2011, empregava-se a técnica contraímuno eletroforese (CIE) como metodologia de diagnóstico, e esta detectava as bactérias *N. meningitidis* e *H. influenzae*. Esta técnica se baseia na detecção de polissacarídeo da cápsula destas bactérias utilizando antissoros hiperimunes. Sendo estes anticorpos policlonais, há ocorrência de reatividade cruzada, dada a similaridade antigênica com polissacarídeos capsulares de outras espécies.⁶ Além disso, esta técnica é sorotipo ou sorogrupo dependente, ou seja, não capta todas as variações dentro de uma mesma espécie. Por isso, a técnica de qPCR, que apresenta maior sensibilidade, foi implantada e validada no IAL para substituição da CIE. A técnica de qPCR utilizada no IAL se baseia numa reação triplex para detecção dos genes *ctrA* de *N. meningitidis*, *lytA* de *S. pneumoniae* e *bexA* de *H. influenzae*⁷, sendo este último posteriormente substituído pelo gene *hpd*.⁸ Estes alvos foram escolhidos para que a reação fosse capaz de detectar todas as variantes de uma mesma espécie das 3 que são objetos de identificação por essa técnica, ou seja, não é uma reação sorotipo ou sorogrupo dependente, como a CIE. Em 2011, houve a implantação da qPCR no CLR Santo André, e com isso permitiu ampliar os agentes detectados com a inclusão de *S. pneumoniae*, já que o mesmo não era contemplado pela técnica de CIE.

Portanto, este trabalho teve como objetivo principal avaliar o impacto da implantação da metodologia de qPCR, utilizada no diagnóstico da meningite bacteriana nos municípios atendidos pelo CLR Santo André, sendo eles Diadema, Mauá, Ribeirão Pires, Rio Grande da Serra, Santo André, São Bernardo do Campo e São Caetano do Sul, no período de 2009 a 2018. Para tanto, os objetivos secundários foram:

avaliar a quantidade de exames realizadas no período, obter as médias mensais, avaliar a positividade obtida para ambas as técnicas e comparar os resultados obtidos pela a técnica de CIE, no período em que ela era adotada no CLR Santo André, versus os resultados obtidos após a introdução da qPCR. Além disso, para fins epidemiológicos, avaliou-se quais foram os municípios requisitantes, bem como a prevalência das bactérias causadoras de meningite na região.

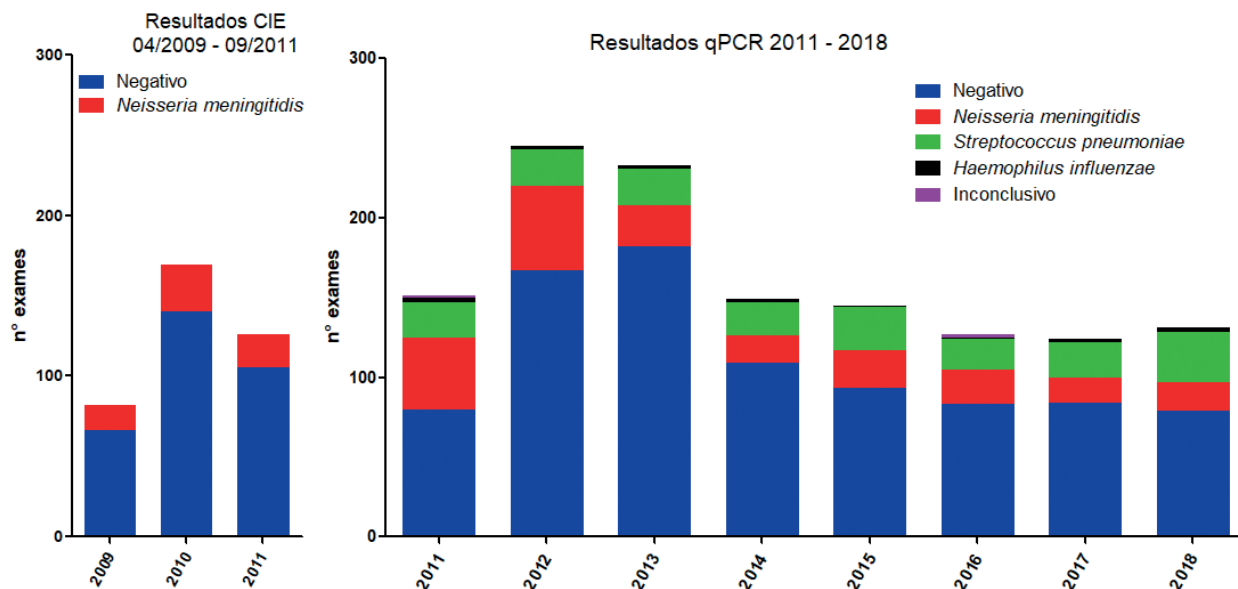
METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados os dados do Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (SIGH), que é o banco de dados utilizado pelo IAL para gerenciamento das amostras de meningite bacteriana. Foram compilados os dados no período de abril/2009, momento da implantação desse sistema no laboratório, até dezembro/2018 de todas as amostras biológicas cadastradas de pacientes com suspeita de meningite bacteriana. Foram excluídos pacientes em duplicata com mesma data de admissão, e foi mantida as amostras que conferiram resultado positivo para a técnica utilizada. Avaliou-se a quantidade total de exames realizados, a média mensal e positividade no período, bem como os municípios requisitantes, de ambas as técnicas utilizadas no CLR Santo André, a CIE e a qPCR. Também foi avaliada a prevalência das bactérias causadoras de meningite no mesmo período. As médias foram comparadas por teste t ou análise de variância (ANOVA), de acordo com os dados, e foram consideradas com diferença estatística com $p < 0,05$.

RESULTADOS

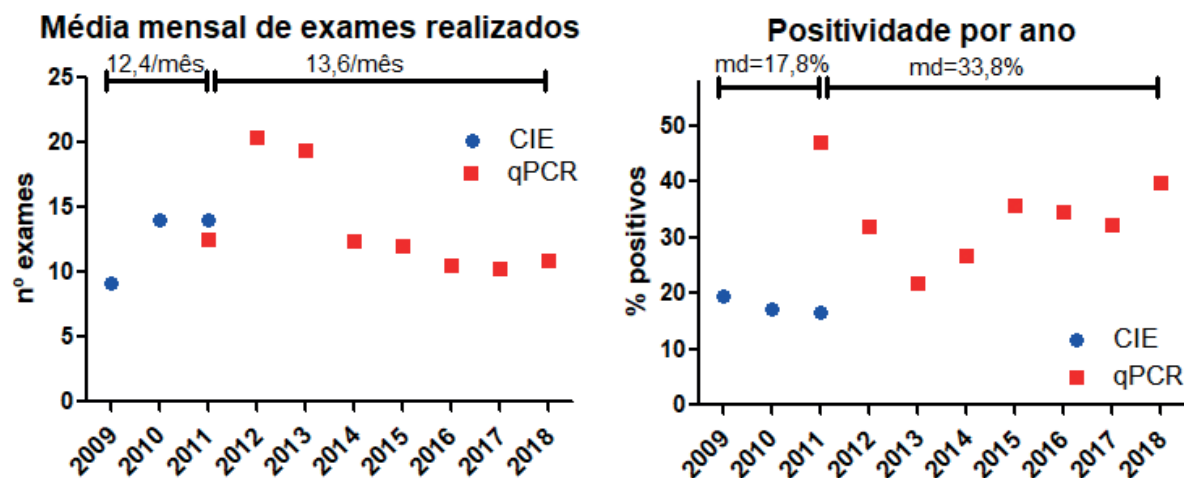
No período de abril/2009 a setembro/2011, momento em que foi suspenso, foram realizados 377 exames de CIE, já excluído as repetições de um mesmo paciente. No ano de 2011, foram computados os exames de qPCR realizados nos dois laboratórios do IAL, pois inicialmente a técnica de qPCR era realizada somente no IAL Central, e depois, em setembro/2011, passou a ser realizada no CLR Santo André com as amostras da região. No período de 2011 a dezembro/2018, foram realizados 1305 exames de qPCR, excluído as repetições para diferentes amostras biológicas de um mesmo paciente (soro e LCR) e considerado apenas os resultados positivos destas repetições quando eram discordantes. De 2010 a 2013, observou-se média anual de 230 exames realizados. Se for considerado que no ano de 2011 duas técnicas diferentes foram utilizadas, obtivemos uma quantidade maior de exames realizados, de 277 exames neste ano. Depois, no período de 2014 a 2018, houve um leve declínio para cerca de 130 exames anuais (Figura 1). A média anual de exames de CIE (2009-2011) foi 125,7/ano e de qPCR (2011-2018) foi 163,1/ano, e não apresentou diferença estatística. Apesar da leve flutuação observada no período do estudo, a média mensal de exames realizados foi similar entre ambas as técnicas adotadas, 12,4 exames/mês para CIE e 13,6/mês para qPCR (Figura 2).

Figura 1 – Número de exames realizados pela técnica CIE no período de 2009 a 2011 e de qPCR no período de 2011 a 2018 na região do ABC paulista/SP.



Fonte: Autoria própria

Figura 2 – Média mensal de exames e porcentagem dos resultados positivos nos anos de 2009 a 2018 na região do ABC paulista/SP. Em 2011, estão representados os exames de ambas as técnicas CIE e qPCR.



(md = média)

Fonte: Autoria própria

Quanto a sensibilidade das técnicas, pode-se observar que, no período avaliado para a técnica de CIE, não houve detecção de casos de *H. influenzae* (Figura 1). Enquanto que, para qPCR, observou-se um grande aumento na porcentagem de resultados positivos/ano quando a técnica foi implantada, pois ela tem maior número de agentes etiológicos avaliados, ou seja, devido à inclusão do *S. pneumoniae* no painel de bactérias analisadas (Figura 2). Nos anos subsequentes à implantação da técnica de qPCR, houve uma queda na positividade anual (Figura 2). Ainda

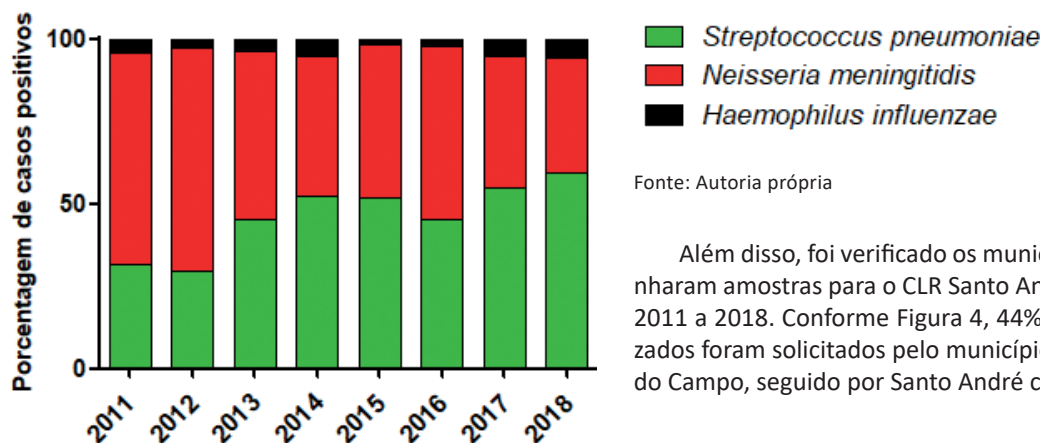
assim, a média de positividade anual entre as duas técnicas, no período avaliado, foi de 17,8 para CIE e 33,8 para qPCR, e apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,01$).

Adicionalmente, verificou-se a prevalência das bactérias circulantes na região durante o período em que a técnica de qPCR foi analisada. Observou-se que *N. meningitidis* foi responsável pela maioria dos casos de meningite bacteriana nos anos de 2011 a 2013, com cerca de 61% dos casos positivos. Nos anos seguintes, 2014 a 2018, a predominância dos casos positivos foi de

S. pneumoniae, com cerca 53% (Figura 3). No entanto, quando comparado o período inteiro de 2011 a 2018, a média da porcentagem de positividade foi de 46,3% para

S. pneumoniae e 49,9% para *N. meningitidis*, o que não apresentou diferença estatística.

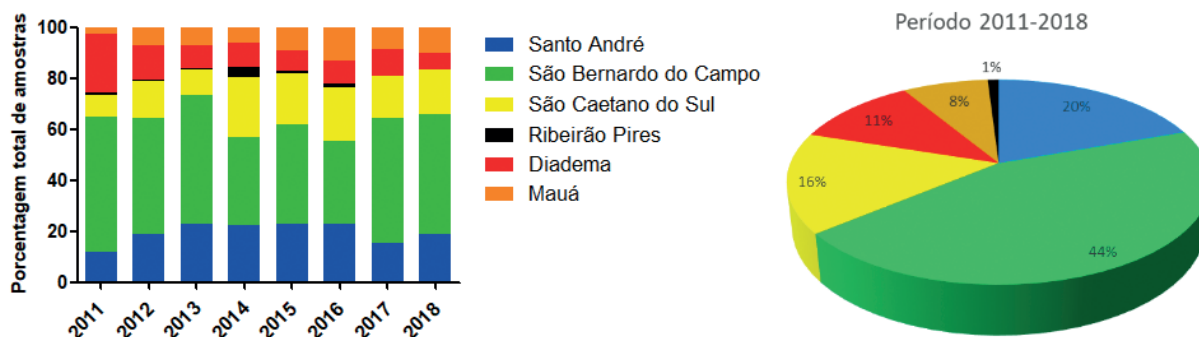
Figura 3 – Etiologia dos casos de meningite bacteriana confirmados por qPCR na região do ABC paulista/SP, no período de 2011 a 2018.



Fonte: Autoria própria

Além disso, foi verificado os municípios que encaminharam amostras para o CLR Santo André no período de 2011 a 2018. Conforme Figura 4, 44% dos exames realizados foram solicitados pelo município de São Bernardo do Campo, seguido por Santo André com 20%.

Figura 4 – Distribuição da porcentagem de ensaios realizados de qPCR entre os municípios requisitantes da região do ABC paulista/SP, no período de 2011 a 2018.



Fonte: Autoria própria

DISCUSSÃO

A técnica de CIE, padronizada no Instituto Adolfo Lutz (IAL) para os antígenos A, B e C e posteriormente W de *N. meningitidis* e o tipo b de *H. influenzae*, vem sendo utilizada desde 1970, por toda rede de laboratórios do IAL e 20 dos 27 Laboratórios de Saúde Pública (LACEN) do Brasil.⁶ Porém, devido ao seu alto custo para compra de antissoras específicos e sua inespecificidade por apresentar reatividade cruzada com outros polissacarídeos de cápsula, a técnica de PCR em tempo real (qPCR) foi padronizada para o diagnóstico destes importantes patógenos causadores de meningite bacteriana com maior especificidade e sem a necessidade de crescimento prévio do microrganismo, que são fastidiosos e de difícil crescimento em laboratório. Adicionalmente, esta técnica permitiu a inclusão de outro agente bacteriano, *S. pneumoniae*, que apresenta mais de 90 sorotipos. De maneira geral, a técnica de qPCR

baseou-se na detecção de genes presentes em todas as variações de uma espécie, portanto, capaz de detectar todos os sorotipos e/ou sorogrupos dentro de uma mesma espécie, tornando mais sensível e sem a reatividade cruzada apresentada pela CIE.

Os resultados deste estudo mostram que a técnica de qPCR foi mais eficiente em detectar os agentes etiológicos das meningites bacterianas nos municípios do ABC paulista do que a técnica de CIE, visto a ausência de detecção de *H. influenzae* pela técnica de CIE. O aumento na positividade observada após a introdução da qPCR comprova sua maior sensibilidade de detecção, pois é independente dos antígenos de superfície que diferencia as cepas em sorotipos e/ou sorogrupos, e sim detecta a presença do DNA bacteriano específico. Além do fato que um maior número de agentes foi avaliado por qPCR. Adicionalmente, a queda observada nas solicitações de

exames nos anos de 2013 a 2018, bem como a queda do número de casos positivos, provavelmente se deve à introdução das vacinas conjugadas no Programa Nacional de Imunização em 2010, ou uma possível falta de encaminhamento das amostras ao laboratório de referência da região, o CLR Santo André, para confirmação do diagnóstico. Adicionalmente a prevalência de *N. meningitidis* e de *S. pneumoniae* na região, observada neste estudo, corresponde com a observada no Brasil.⁹ Quanto aos municípios requisitantes, observou-se que os municípios que mais enviaram amostras ao CLR Santo André foi São Bernardo do Campo, seguido por Santo André, provavelmente porque estes são os municípios mais populosos da região, com quase 1,5 milhões dos mais de 2,5 milhões de habitantes da região do ABC paulista¹⁰, ou também talvez porque possuem a Vigilância Epidemiológica Municipal mais atuante, obtendo, portanto, maior número de suspeitos para o diagnóstico de meningite bacteriana.

As vacinas conjugadas são de grande importância mundial para o controle das meningites bacterianas, sendo que no Brasil, elas foram introduzidas em 1999 para *H. influenzae* e 2010 para *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*.⁴ Elas são eficientes, geram resposta imune T-dependente e resposta imunológica de memória, porém induzem resposta sorotipo e/ou sorogrupo dependente, podendo, portanto, ocorrer o fenômeno da substituição dos sorotipos circulantes induzida pela vacina.¹¹ Portanto, é de suma importância o monitoramento constante não só das espécies causadoras de meningite bacteriana, mas também dos sorotipos e/ou sorogrupos causadores de doenças, para certificar a cobertura das vacinas que estão sendo empregadas. Por esta razão, além de empregar a técnica de qPCR para identificação das espécies causadoras de meningite bacteriana, o IAL a utiliza para a genogrupagem e genotipagem de *N. meningitidis* e *H. influenzae*, respectivamente. No entanto, para *S. pneumoniae*, que apresenta mais de 90 sorotipos existentes¹², ainda não há disponível uma metodologia de biologia molecular empregada na rotina, que contemple todos os sorotipos existentes. São adotadas as técnicas clássicas de soroaglutinação para identificação dos sorotipos que são técnicas caras, que requerem profissionais capacitados e que principalmente requerem o envio das cepas isoladas ao laboratório de referência. No entanto, existe os entraves de que estas cepas são de difícil isolamento por serem organismos fastidiosos e ainda se necessita do empenho e cooperação de toda a rede de laboratórios e hospitais que trabalham com os materiais biológicos dos pacientes e da Vigilância Epidemiológica para seu encaminhamento em tempo hábil para não comprometer sua viabilidade.

CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou a importância da implantação da técnica de qPCR como ferramenta de diagnóstico das meningites bacterianas na região do ABC paulista, e justifica a necessidade da substituição da técnica de CIE pela qPCR aplicada pelo IAL. Portanto, suporta sua implantação

em outros laboratórios do país em substituição ou como complementação de técnicas menos sensíveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido (nº 2017/03022-6). Agradecem também à Delma Aparecida Molinari e Patricia Vicente pelo apoio técnico e Vilma dos Santos Menezes Gaiotto Daros pelo apoio institucional.

REFERÊNCIAS

1. HONDA, H.; WARREN, D.K. Central Nervous System Infections: Meningitis and Brain Abscess. **Infectious Disease Clinics of North America**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 609–623, 2009.
2. SIEGEL, S.J.; WEISER, J.N. Mechanisms of Bacterial Colonization of the Respiratory Tract. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 69, p. 425–444, 2015.
3. VAN DE BEEK, D. Progress and challenges in bacterial meningitis. **Lancet**, Amsterdam, v. 380, n. 9854, p. 1623–1624, 2012.
4. AZEVEDO, L.C.P.; TOSCANO, C.M.; BIERRENBACH, A.L. Bacterial Meningitis in Brazil: Baseline Epidemiologic Assessment of the Decade Prior to the Introduction of Pneumococcal and Meningococcal Vaccines. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e64524, 2013.
5. LIPHAUS, B.L. *et al.* Meningite: O que precisamos saber? **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, São Paulo, v. 15, n. 178, p. 23–32, 2018.
6. FUKASAWA, L.O. *et al.* Limitações no uso da técnica de contraímunoelctroforese (CIE) para o diagnóstico das meningites causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, São Paulo, vol. 7, n. 76, p. 4–12, 2010.
7. SACCHI, C.T. *et al.* Incorporation of Real-Time PCR into Routine Public Health Surveillance of Culture Negative Bacterial Meningitis in São Paulo, Brazil. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 6, p. e20675, 2011.
8. SALGADO, M.M. *et al.* Nova versão do ensaio da PCR em tempo real para o diagnóstico laboratorial e vigilância epidemiológica das meningites bacterianas. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, São Paulo, v. 9, n. 103, p. 16–20, 2012.
9. PAIREAU, J. *et al.* Seasonal dynamics of bacterial meningitis: a time-series analysis. **Lancet Global Health**, Amsterdam, v. 4, n. 6, p. e370–e377, 2016.
10. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Informações sobre os municípios brasileiros. **Censo Demográfico**. Rio de Janeiro, 2010.
11. POLLARD, A.J.; PERRETT, K.P.; BEVERLEY, P.C. Maintaining protection against invasive bacteria with protein–polysaccharide conjugate vaccines. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 9, n. 3, p. 213–220, 2009.
12. GENO, K.A. *et al.* Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 28, n. 3, p. 871–899, 2015.

Submetido em: 02/10/2019

Aceito em: 19/02/2020