

REA 01 - Identificação dos principais agentes etiológicos das meningites bacterianas por PCR em tempo real

Aline Carvalho de Azevedo^{1*}; Claudia Ferreira Andrade¹; Ivano de Filippis¹.

¹ INCQS / Fiocruz.

Introdução:

As meningites bacterianas são caracterizadas como doenças infectocontagiosas de rápida evolução e altas taxas de mortalidade. Os principais agentes etiológicos são a *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e o *Streptococcus pneumoniae*, que podem causar outras doenças invasivas como septicemia e pneumonia. Apresentam distribuição mundial com predomínio no inverno, o que facilita a transmissão devido à aglomeração populacional em locais fechados. A transmissão ocorre pelo contato direto por via respiratória entre portadores e acomete principalmente crianças e adultos jovens. Por ser definida como doença aguda de evolução rápida, é essencial o uso de métodos de identificação rápidos e sensíveis. Métodos moleculares baseados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) são amplamente utilizados no diagnóstico de doenças infecciosas, como a PCR em Tempo Real (qPCR), que permite o monitoramento da amplificação gerada durante a corrida através de fluoróforos intercalantes ou sondas marcadas com fluorescência. Essas modificações tornam a qPCR um método mais sensível e específico quando comparado à PCR convencional.

Objetivo:

Identificar os principais agentes etiológicos das meningites bacterianas por PCR em tempo real pelos sistemas Taqman e *High Resolution Melting* (HRM) como método de diagnóstico com menor custo, tempo de análise e maior sensibilidade.

Metodologia:

Foram utilizados microrganismos de referência e amostras clínicas do período de 2012 a 2015, da Coleção de Pesquisa do INCQS, em dois sistemas qualitativos. O sistema Taqman é caracterizado pela atividade 5' exonuclease da Taq DNA polimerase e sondas marcadas com corantes fluorescentes. Os iniciadores utilizados foram nspA, p6 e ply marcados na extremidade 5' com corantes fluorescentes FAM, HEX e Cy5, respectivamente para detecção de *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae*. O

sistema HRM identifica SNP nas sequências dos genes-alvo, caracterizando as amostras pelo comportamento de dissociação e transição da dupla fita para fita simples pelo aumento da temperatura. O corante fluorescente Evagreen foi utilizado como corante intercalante. Após a extração e dosagem do DNA, foram realizadas diluições seriadas para a determinação do limite de detecção.

Resultado:

Testes com sistema Taqman uniplex e HRM uniplex revelaram limites de detecção (LD) similares (200 fg/ μ L). Taqman multiplex revelou LD na faixa de 1-2 pg/ μ L. Ambos os métodos foram capazes de detectar os três agentes etiológicos. Trinta por cento das amostras com resultados negativos por PCR convencional mostraram-se positivas por qPCR (Taqman e HRM). O método de diagnóstico por HRM provou ser tão sensível quanto o Taqman, porém mais barato, pois não há necessidade de usar sondas.

Conclusão:

Pela efetividade dos resultados, o HRM poderia ser utilizado como uma ferramenta nova para o diagnóstico de doenças invasivas, melhorando o prognóstico dos pacientes, podendo ser adotado por laboratórios públicos de países em desenvolvimento para fins de diagnóstico.

Palavras-chave: Meningites bacterianas; PCR em Tempo Real; Diagnóstico molecular