

## Avaliação de resultados discrepantes obtidos na execução de PCR em tempo real em amostras de pacientes com suspeita clínica de meningite bacteriana

### Inconsistent results in real-time PCR in analyzing samples from patients with suspected bacterial meningitis

RIALA6/1558

Maristela Marques SALGADO, Maria Gisele GONÇALVES, Fabio Takenori HIGA, Lucila Okuyama FUKASAWA, Priscilla Lima de OLIVEIRA, Carla Naufal da SILVA, Claudio Tavares SACCHI

\*Endereço para correspondência: Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar, CEP: 01246-000, Cerqueira César, São Paulo – SP, Brasil. Tel.: (11) 3068-2899. E-mail: rede.pcr@gmail.com

Recebido: 14.09.2012 - Aceito para publicação: 26.06.2013

#### RESUMO

O princípio básico para obter resultado confiável é a compatibilidade entre as réplicas e sua reprodutibilidade. Na rotina diagnóstica por PCR em tempo real (PCR-TR), em que centenas de amostras são processadas, a obtenção de resultados com Cts tardios ou réplicas que diferem entre si por mais de três unidades, são inevitáveis. Das 3.000 amostras processadas em 2010, em duplicata, na rotina diagnóstica das meningites bacterianas por PCR-TR na pesquisa de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, 157 (5,2 %), apresentaram inconsistência entre as réplicas (diferença entre Cts maior do que 3) e/ou altos valores de Cts; e os ensaios foram retestados. O presente trabalho investigou estes resultados obtidos, os benefícios destas repetições e as possíveis razões da ocorrência dos resultados discrepantes. Verificou-se que, apenas 18 (11 %) das amostras submetidas à repetição, apresentaram resultados positivos. Erros humanos inerentes à pipetagem, como o uso de pipetas não calibradas, a baixa concentração de DNA alvo nas amostras, a degradação da sonda ou mesmo a possível contaminação aleatória são fatores que contribuem para induzir resultados discrepantes. A realização do ensaio de PCR-TR com amostras em duplicata e a repetição de ensaios com resultados discordantes é um artifício eficiente para avaliar e definir estes resultados.

**Palavras-chave.** reação em cadeia da polimerase em tempo real, meningite bacteriana, diagnóstico laboratorial, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*.

#### ABSTRACT

The basic principle for obtaining a reliable result is the consistency found among the replicas and its reproducibility. In a diagnostic routine by using real-time PCR (RT-PCR), when hundreds samples are processed, and results with late Cts or replicas that differ by more than three units are inevitable. Of 3,000 samples processed in 2010, in duplicate, in the diagnostic routine of bacterial meningitis by RT-PCR for detecting *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* and *H. influenzae*, 157 (5.2 %) samples showed inconsistency among replicas (difference between Cts higher than three units) and/or high Cts values; and the samples were retested. This study assessed these results, the benefits of its repetitions and probable reasons for the occurrence of these discrepant results. Among the retested samples, 18 (11 %) only showed positive results. Human errors inherent to pipetting, use of non-calibrated pipettes, low concentration of target DNA in the analyzed samples, probe degradation or even random contamination are factors which contribute to induce the discrepant results. Performing RT-PCR assay with samples in duplicate and retesting the samples showing discordant results constitute a device for efficiently evaluating and defining these results.

**Keywords.** real-time polymerase chain reaction, bacterial meningitis, laboratory diagnosis, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*.

O diagnóstico definitivo das meningites bacterianas, doença meningocócica e pneumonia bacteriana requer o isolamento de *Neisseria meningitidis* (Men), *Haemophilus influenzae* (Hi), *Streptococcus pneumoniae* (Spn) ou outro agente bacteriano de sítios estéreis, tais como: líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido pleural, soro, plasma, sangue e tecidos. Entretanto, o número de casos da doença confirmados por cultura é baixo (entre 10 e 30 %), sendo esta baixa positividade decorrente de várias razões, entre elas: as condições inadequadas de cultivo e/ou transporte ou uso de antibióticos previamente à coleta da amostra clínica<sup>1</sup>. O teste de aglutinação do látex e a contraímunoeletroforese não são suficientemente sensíveis para detectar a presença de alvos bacterianos, quando estes se encontram em pequena quantidade nas amostras clínicas<sup>2</sup>. Mesmo a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional pode não ser suficientemente sensível para detectar a presença de pequeno número do DNA alvo.

A PCR em Tempo Real (PCR-TR) é uma modificação da técnica tradicional de PCR que identifica o DNA alvo com maior sensibilidade e especificidade e em menor tempo de reação. A amplificação e a detecção são realizadas simultaneamente em um sistema fechado. Adicionalmente aos iniciadores, o sistema inclui um terceiro oligonucleotídeo na reação, conhecido como sonda. As reações de TaqMan® PCR-TR utilizam sondas lineares de hidrólise que possuem um marcador fluorescente (*reporter*) ligado à parte final 5' e um capturador de fluorescência (*quencher*) unido à parte final 3'. Enquanto estas duas moléculas (*reporter* e *quencher*) estiverem próximas (ligadas à sequência linear de nucleotídeos), a fluorescência do *reporter* será capturada pelo *quencher* e não haverá detecção de sinal pelo aparelho.

A metodologia da TaqMan® PCR-TR é baseada na detecção e quantificação do sinal fluorescente, que aumenta em proporção direta com a quantidade do produto amplificado na reação de PCR. O ciclo de amplificação onde o sinal cruza o *threshold* é chamado de *cycle threshold* ou Ct. Geralmente, suspensões bacterianas ou DNA purificado a partir de amostras de LCR, líquido pleural, soro, plasma, sangue e tecidos provenientes de casos de meningite ou pneumonia bacteriana confirmados por cultura ou com clínica compatível, produzem valores de Ct menores que 39. Valores de Ct maiores ou iguais a 39 são considerados "tardios", podendo ou não ser verdadeiros<sup>3</sup>.

Em nosso laboratório, a PCR-TR para a detecção de Men, Spn e Hi é feita pelo método TaqMan® em formato *triplex*<sup>3</sup>. Neste ensaio, três genes são pesquisados: um específico para Men (*ctrA*), um para Spn (*lytA*) e um para Hi (*bexA*)<sup>4,5,6</sup>. Um gene confirmatório da presença de material genético humano na amostra (gene da RNaseP humana) é pesquisado separadamente em ensaio no formato *single*<sup>7</sup>. O gene *ctrA* está envolvido no processo de transporte da cápsula polissacarídica através da membrana externa de Men. O gene *lytA* é responsável pela produção da autolisina em Spn, enquanto o gene *bexA* codifica a expressão da cápsula polissacarídica em Hi. O gene da RNaseP humana é utilizado para: (i) verificar a qualidade da extração do material genético da amostra (presença de agentes inibitórios) e (ii) confirmar a presença de material humano.

A literatura mostra que não há padrões com relação aos *cut-offs* para a PCR-TR ou critérios definidos para análise de resultados e classificação de amostras como positivas. Alguns pesquisadores estabelecem um valor de Ct como *cut-off* para um determinado ensaio, enquanto outros consideram qualquer sinal de amplificação indicativo de positividade, independentemente do valor do Ct. Alguns pesquisadores testam as amostras em duplicata (réplicas), outros não. Quanto ao número de ciclos, também não há um padrão estabelecido, o qual pode variar entre 40 e 50 ciclos; todavia, a lógica para estas escolhas nem sempre é clara.

Devido à escassez de trabalhos relacionados com a avaliação de réplicas e à falta de consenso no estabelecimento de valores de *cut-off* em ensaios de PCR-TR, este trabalho teve por objetivo avaliar a importância de verificar as reações de PCR-TR em duplicata e de repetir as reações que apresentem altos valores de Ct (Cts tardios), quando realizadas em laboratórios de rotina diagnóstica. Esta prática pode ajudar a garantir confiabilidade nos resultados liberados, além de poder dar indícios de problemas relacionados às pipetagens ou à baixa concentração de DNA alvo nas amostras.

Cálculos matemáticos mostram que, se partirmos de uma única cópia do gene alvo, a curva exponencial de sua amplificação deverá cruzar o *threshold* por volta do ciclo 40 (Ct = 40). Portanto, se considerarmos que uma cópia é teoricamente o limite mínimo de detecção na PCR-TR e que a eficiência da reação foi próxima de 100 % (o dobro a cada ciclo), qualquer Ct acima de 40 seria inválido.

De acordo com nossos dados, amostras com Cts 40/41 possuem grande possibilidade de serem falsos positivos, pois a grande maioria delas, não possui reprodutibilidade e sinais de Cts nesta faixa podem ser artefatos e não uma amplificação real.

Baseado nestes argumentos, usamos em nossa rotina diagnóstica um *cut-off* de 39 (amostras positivas devem possuir valores de  $Ct \leq 39$ )<sup>2</sup>. Resultados com valores de 40 e 41 foram considerados inconclusivos e, dessa forma, foram repetidos. Todos os resultados com valores de Cts iguais a zero ou maior do que 41 nas repetições foram considerados negativos.

Durante o ano de 2010, nosso laboratório processou 3.000 amostras, em duplicata, na rotina diagnóstica das meningites bacterianas por PCR-TR na pesquisa de Men, Spn e Hi. Deste total, 157 (5,2 %) amostras apresentaram inconsistência entre réplicas (diferença entre Cts maior que 3) e/ou altos valores de Cts e foram repetidas. Com a finalidade de investigar estes resultados e os benefícios de suas repetições, estes dados foram extraídos do banco de dados do ano de 2010 e reanalisados. Das 157 amostras, 46 % (n = 72) foram de LCR e 54 % (n = 85) de soro. Com relação ao volume disponível para o exame, 76 % (n = 55) das amostras de LCR e 98 % (n = 83) das de soro, possuíam volumes ideais para processamento. Para facilitar as análises, as amostras foram divididas em 5 diferentes grupos de acordo com os resultados do primeiro ensaio (Tabela).

**Tabela.** Comparação dos resultados do primeiro ensaio e os da repetição entre os 5 grupos de amostras submetidas ao ensaio de PCR-TR *Triplex*

Casos	Grupos					Total
	1	2	3	4	5	
Primeiro ensaio	103	10	36	2	6	157
	66 %	6 %	23 %	1 %	4 %	100 %
Converteram para Positivo	0	0	10	2	6	18
	0 %	0 %	28 %	100 %	100 %	11 %
Converteram para Inc	6	1	8	0	0	15
	6 %	10 %	22 %	0 %	0 %	10 %
Converteram para Negativo	97	9	18	0	0	124
	94 %	90 %	50 %	0 %	0 %	79 %

Grupo 1: Réplicas com o  $Ct_1/Ct_2 = 0/38, 0/39, 0/40$  ou  $0/41$

Grupo 2: Réplicas consistentes, mas consideradas como resultado inconclusivo ( $Ct_1/Ct_2 = 40/40, 40/41, 41/41$ )

Grupo 3: Réplicas consistentes, mas com  $Ct_1/Ct_2 = 39/37, 39/38, 39/39, 39/40, 39/41$

Grupo 4: Réplicas inconsistentes (diferença entre Cts >3:  $Ct_1/Ct_2 = 18/25, 32/36$ )

Grupo 5: Réplicas consistentes, mas com  $Ct_1/Ct_2 = 37/40, 38/38, 38/40, 38/41$

A grande maioria das repetições foram feitas na amostragem do grupo 1 (66 %), em que um Ct da duplicata é igual a zero e o outro é tardio, igual a 38, 39, 40 ou 41. Nenhum dos 5 grupos de repetições estão relacionados a um tipo específico de amostra, LCR ou soro. Das amostras do Grupo 1, nenhuma passou a ser positiva após repetição (Tabela).

Algumas condições podem explicar estes resultados discrepantes. Quanto mais baixa a concentração do DNA alvo na preparação, maior a probabilidade de obter Cts elevados e com duplicatas discordantes. Quando a concentração de DNA na amostra original é elevada, a probabilidade das duas alíquotas apresentarem a mesma quantidade de DNA é maior, resultando em maior grau de concordância. Entretanto, quando a concentração de DNA em solução é muito baixa, em torno de poucos fentogramas, é estatisticamente improvável que as duas alíquotas coletadas simultaneamente possuam a mesma concentração de DNA, apesar de terem os mesmos volumes. Problemas na pipetagem das amostras devido a erros humanos, o uso de pipetas não adequadamente calibradas ou ponteiras inadequadas, também podem contribuir para que resultados discrepantes aconteçam. Entretanto, não podemos deixar de considerar que reações de PCR-TR podem emitir sinais tardios, devido à degradação das sondas. Outro motivo para a obtenção de Cts tardios com duplicatas não compatíveis é a contaminação. Em consequência da alta sensibilidade do ensaio e da facilidade do DNA em estar suspenso no ambiente de trabalho, o uso de condições laboratoriais inadequadas na manipulação de DNA pode contaminar aleatoriamente alguns poços das placas de reação.

Para todos os casos de Cts tardios ou réplicas inconsistentes, a repetição do experimento pode indicar o provável motivo deste resultado inicial não compatível. Nossas análises demonstraram que nenhuma repetição feita para os grupos 1 e 2 (Tabela), apresentou resultado positivo. As razões mais prováveis para isso são: a baixa concentração de DNA alvo na amostra, a degradação da sonda ou, até mesmo, a possível contaminação aleatória. Como o princípio básico de um resultado confiável é a compatibilidade dos resultados entre as duplicatas e sua reprodutibilidade, as repetições são justificáveis.

Os resultados obtidos com as repetições dos casos do Grupo 3 estão relacionados ao Ct de 39, utilizado como *cut-off* para positividade (Tabela).

Este é um Ct considerado tardio e apenas 28 % se mantiveram positivos após repetição. Estes resultados, em conjunto com os obtidos com as amostras do Grupo 2 (Cts 40/41), demonstraram que apenas 6,7 % das 149 amostras submetidas à repetição apresentaram resultado positivo, sugerindo que o *cut-off* utilizado neste ensaio para definir positividade, deveria ser modificado para Cts  $\leq$  38. Cts iguais a 39 passam a ser considerados inconclusivos, e Cts  $\geq$  40 passam a ser considerados negativos.

Os motivos para a inconsistência das réplicas que levaram a repetição do ensaio nas amostras do Grupo 4 estão relacionados a erros humanos na pipetagem, já que os resultados das repetições mostraram Cts compatíveis e positivos.

As repetições das amostras no Grupo 5 foram feitas apenas para confirmar a positividade já que o Ct do ensaio inicial é considerado tardio e próximo do *cut-off*. Os resultados mostraram compatibilidade das réplicas e confirmaram a positividade destas amostras.

Em laboratórios com uma grande rotina diagnóstica por PCR-TR, onde centenas de amostras são processadas, a obtenção de resultados com Cts tardios ou com réplicas que diferem entre si por mais de 3 unidades são inevitáveis. Erros humanos inerentes à pipetagem; uso de pipetas não calibradas e ponteiras inadequadas; e a concentração de DNA alvo nas amostras são fatores que contribuem para a obtenção de resultados duvidosos. A realização do ensaio de PCR-TR com amostras em duplicata e a repetição de ensaios com resultados

discrepantes constitui-se um artifício eficiente para avaliar e definir estes resultados.

## REFERÊNCIAS

1. Wu HM, Cordeiro SM, Harcourt BH, Carvalho MGS, Azevedo J, Oliveira TQ, et al. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis. *BMC Infect Dis*. 2013;13:26-44.
2. Fukasawa LO, Salgado MM, Marques EGL, Fernandes RMBP, Kemp B, Carvalhanas TR. Validação da técnica de contraímunoelctroforese (CIE) para o diagnóstico laboratorial das meningites causadas por *Neisseria meningitidis* sorogrupos A, B, C e W135. *BEPA*. 2012;9(102):13-20.
3. 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;6:1-8.
4. Mothershed EA, Sacchi CT, Whitney AM, Barnett GA, Ajello GW, Schmink S, et al. Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*. 2004;42:320-8.
5. Carvalho MGS, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR detection assays to *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2460-6.
6. 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;39:1553-8.
7. 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. *Emerging Infect Dis*. 2004;10:311-6.