UNIVERSIDADE POTIGUAR – UnP
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
ESCOLA DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ADEILSON FAUSTINO DE SOUZA
GABRIELA CHACON BARBOSA

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR NA DIFERENCIAÇÃO E DIAGNÓSTICO DA MENINGITE VIRAL: UMA REVISÃO DE LITERATURA.

NATAL
2023

ADEILSON FAUSTINO DE SOUZA
GABRIELA CHACON BARBOSA

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR NA DIFERENCIAÇÃO E DIAGNÓSTICO DA MENINGITE VIRAL: UMA REVISÃO DE LITERATURA.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à universidade potiguar – UnP, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em biomedicina.
Orientadora: Profª. Drª Sarah Ferreira de Souza.

NATAL
2023

ADEILSON FAUSTINO DE SOUZA
GABRIELA CHACON BARBOSA

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR NA DIFERENCIAÇÃO E DIAGNÓSTICO DA MENINGITE VIRAL: UMA REVISÃO DE LITERATURA.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à universidade potiguar – UnP, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em biomedicina.
Orientadora: Profª. Drª Sarah Ferreira de Souza.

APROVADO EM: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

_____
Profª Drª Sarah Ferreira de Souza
ORIENTADOR - UNP

_____
1º Examinador

_____
2º Examinador

_____
3º Examinador

Resumo

Este artigo tem como objetivo mostrar o diagnóstico e a diferenciação das meningites, através da técnica de PCR. As meningites são doenças infecciosas e inflamatória das meninges, podendo ser causada por agentes etiológicos ou acidentes. Elas podem ser classificadas em como meningite asséptica (MA) ou meningite bacteriana (MB). A identificação desses agentes causadores das meningites, devem ser de emergência, por isso o diagnóstico de forma rápida e segura é totalmente relevante. A técnica em PCR vem ganhando destaque na biologia molecular; por ser um processamento rápido de um resultado quase que 100%. A reação em cadeia da polimerase em tempo real é uma variação da técnica convencional, a sua diferença é que na técnica de PCR em tempo real haverá um nível de fluorescência proporcional ao aumento do número de cópias do alvo da reação. O gênero etiológico da meningite viral (enterovírus) é de RNA simples, por tanto, para sua identificação na PCR, é preciso passar pelo processamento da transcriptase reversa para amplificar o RNA viral. Nos resultados desse artigo analisados de revisões literárias, foram selecionadas 616 amostras de LCR de pacientes com meningite, com ênfase em meningite viral, os primers utilizados nas amostras foram para o gênero EV da meningite, sendo eles: 5'-CCCTGAATGCGGCTAATCC-3', anti-senso 5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3' e probe FAM 5'-AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-3' BHQ. As análises da curva padrão, foi observado a eficácia de amplificação de 99,80 %. Os resultados fidedignos mostram que a PCR é uma técnica na biologia molecular que pode ser totalmente eficaz para a detecção e diferenciação de vírus e bactérias, por sua capacidade de amplificação de um fragmento de DNA ou RNA.

Palavras-chave. PCR, MENINGITE VIRAL, enterovírus, DNA, RNA.

ABSTRACT

This article aims to show the diagnosis and differentiation of meningitis through the PCR technique. Meningitis is an infectious and inflammatory disease of the meninges, and can be caused by etiological agents or accidents. They can be classified as aseptic (MA) or bacterial (MB). The identification of these causative agents of meningitis must be an emergency, so a quick and safe diagnosis is totally relevant. The PCR technique has been gaining gaining prominence in molecular biology; because it is a fast processing of an almost 100% result. Real-time polymerase chain reaction is a variation of the conventional technique, its difference is that in the real-time PCR technique there will be a level of fluorescence proportional to the increase in the number of copies of the reaction target. The etiological genus of viral meningitis (enterovirus) is of simple RNA, therefore, for its identification in PCR, it is necessary to go through the processing of the reverse transcriptase to amplify viral RNA. In the results of this article, the results of literature reviews were analyzed, 616 CSF samples from patients with meningitis were selected, with emphasis on viral meningitis, the primers used in the samples were for the IV genus of meningitis, namely: 5'-CCCTGAATGCGGCTAATCC-3', antisense 5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3' and FAM probe 5'-AACCGACTACTTTGTGTCCGTGTTTC-3' BHQ. In the analysis of the standard curve, the amplification efficacy of 99.80 % was observed. The reliable results show that PCR is a technique in molecular biology that can be totally effective for the detection and differentiation of viruses and bacteria, due to its ability to amplify a fragment of DNA or RNA.

Keywords. PCR, VIRAL MENINGITIS, enterovirus, DNA, RNA.

Sumário

Lista de Siglas e Abreviaturas..... 7
1. Introdução..... 8
2. Objetivo..... 9
3. Metodologia..... 9
4. Desenvolvimento..... 9
4.1.DNA E RNA..... 9
4.2 . Técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)..... 10
4.3 Meningite Viral..... 13
4.4. Dados epidemiológico das meningites no Brasil..... 14
4.6. PCR em tempo real, para o diagnóstico e diferenciação das meningites... 15
5. Resultados..... 16
6. Conclusão..... 17
REFERÊNCIAS..... 19

Lista de Siglas e Abreviaturas

RNA	Ácido Ribonucleico
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E. coli	Escherichia coli
pH	Potencial hidrogeniônico
dCTP	desoxiCitidina Trifosfatada
dATP	desoxiAdenosina Trifosfatada
dTTP.	desoxiTimidina Trifosfatada
dGTP.	desoxiGuanosina Trifosfatada
EVS	Enterovírus
HEV	Enterovírus humano
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
cDNA	DNA complementar

1. Introdução

A meningite asséptica, é um termo que se usa para a síndrome aguda da inflamação das meninges. A etiologia mais comum desta síndrome é a viral, sendo os Enterovírus, gênero responsável por aproximadamente 85% dos casos encontrados e pertencente à família Picornaviridae obtendo mais de 100 sorotipos virais. A morfologia dos Enterovírus são vírus pequenos, não envelopados, e possui RNA (ácido ribonucleico) de fita simples e polaridade positivas. Esse vírus acomete frequentemente crianças e adultos estando associado entre 80,00 a 90,00% dos infectados. (MACHADO, Et al, 2015). No Brasil, a meningite é considerada uma doença endêmica. A ocorrência das meningites bacterianas é mais comum no outono-inverno e das virais na primavera ou verão (MINÍSTERIO DA SAÚDE, 2022).

Em sua maior parte, a meningite viral é assintomática, porém, sua caracterização como sintoma é: alterações neurológicas, sendo a principal síndrome infecciosa do sistema nervoso central, entretanto, outros inespecíficos podem aparecer, como: cefaleia, febre, mal-estar, vômitos, fotofobia e rigidez na nuca. A meningite causada pelo Enterovírus pode apresentar sintomas específicos, tais quais: alterações gastrointestinais, respiratórias, erupções cutâneas (VALENÇA, ESTEVÃO, 2018).

Vale salientar que, os sintomas da meningite viral e da meningite bacteriana podem se apresentar de formas semelhantes embora, a viral tenha alguns sintomas específicos. Em vista disso, esplandecer rapidamente sua originalidade é de extrema importância clínica, para que não aja complicações no uso de fármacos perante o tratamento. (Valença, Junior, Estevão, 2018). Diagnosticar a meningite precocemente é de suma importância, portanto, os exames solicitados são cruciais, pois a meningite quando não tratada, pode evoluir para quadros mais graves, além de ser altamente contagiosa. (RODRIGUES, MILAGRES, 2015).

Seu diagnóstico pode ser de diversas formas, no entanto a técnica em cadeia polimerase (PCR) tem ganhado destaque no meio, por apresentar muitos benefícios e rápido resultado, reduzindo o tempo de internação do paciente e

evitando os riscos de contrair alguma infecção hospitalar. Essa técnica consiste na amplificação de um fragmento da amostra do DNA in vitro, produzindo bilhões de cópias. (SENNE, 2010).

O método da transcriptase reversa usa a PCR para amplificar o RNA viral, utiliza-se da reação do grupo 3´ OH de um ribonucleotídeo e um grupo fosfato do carbono 5´ do ribonucleosídeo trifosfato. (POTY, 2011). Essa reação se processa no sentido 5´-´3, onde a síntese começa e as cadeias sofre extensão. (NASCIMENTO, SUAREZ, 2015). Outros parâmetros laboratoriais, também podem ajudar no diagnóstico das meningites e conseguir diferenciar seus tipos. O líquido cefalorraquidiano (LCR) é a amostra que vai ser utilizada para o parâmetro das análises dos exames solicitados, principalmente da reação da PCR em tempo real. (MACHADO et al 2016).

2. Objetivo

O objetivo desse artigo é revisar o fundamento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e descrever a sua utilização no diagnóstico das meningites virais, destacando as vantagens deste método e reforçar a sua importância no diagnóstico correto para a melhor escolha do tratamento e melhor prognóstico do paciente.

3. Metodologia

Para este estudo foi realizada uma revisão de literatura sobre o tema utilização da reação em cadeia da polimerase no diagnóstico das meningites virais. Os artigos utilizados foram escritos preferencialmente em língua portuguesa, publicados no período de 2004 a 2022 e disponíveis nas bases de dados Scielo, Google Acadêmico e PubMed. Foram excluídos os artigos que não se aprofundavam no tema.

Os descritores utilizados na pesquisa foram “reação em cadeia da polimerase” e “meningite”. Após a seleção dos artigos, estes foram lidos e serviram de base conceitual para o desenvolvimento da revisão.

4. Desenvolvimento

4.1.DNA E RNA

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é um ácido nucleico, que é um tipo de polímero, ou seja, macromoléculas formadas por unidades de monômeros, possuindo todas as informações genéticas de um indivíduo. O DNA pode ser encontrado nos cromossomos em células eucariontes. O RNA atua na síntese de proteína, através da tradução da fita de DNA, e formado durante a transcrição do DNA. A estrutura dos nucleotídeos do DNA e RNA são formados por três moléculas: um fosfato, um açúcar e uma base nitrogenada. No DNA o açúcar é a desoxirribose e no RNA é purinas (dois anéis de átomos de carbono e nitrogênio) e as pirimidinas (formadas por um anel). (HEPP, NONOHAY, 2016).

A dupla hélice do DNA é primordial para a replicação do DNA, onde cada hélice vai fazer uma cópia de si mesmo. As bases nitrogenadas do DNA são as purinas, adenina, guanina, pirimidinas, timina ou citosina. No RNA os nucleotídeos podem ter: adenina, citosina, ao em vez da timina, conter a uracila. (HEPP, NONOHAY, 2016). O processo de duplicação do DNA irá ser feito através das informações contidas nas bases nitrogenada, durante o momento de duplicação vão ser repassadas para as fitas filhas. Na transcrição do RNA utiliza-se a molécula de DNA como modelo, e é na transcrição que a célula regula sua expressão gênica. Os métodos de extração do DNA para análises laboratorial, podem ser de diversas formas, é removido o material genético de uma parte e consiste na lise celular e na purificação do DNA obtido. (ALVES, SOUZA, 2013).

4.2 . Técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Em 1983, o cientista Kary Mullis descobriu a técnica de PCR, nos primeiros experimentos o fragmento klenow da DNA polimerase I da *E.coli*, sendo uma enzima que está relaciona ao reparo do DNA e codificada pelo gene poIA, que eram utilizados no processo, entretanto, a cada passo havia a desnaturação da enzima e mais enzimas eram adicionadas. (POTY, 2011).

Algum tempo depois, a enzima taq polimerase, que catalisa a síntese de nucleotídeos nas cadeias de DNA começou a ser utilizada, facilitando o processo de desnaturação da amostra. Essa enzima é retirada da bactéria *thermus aquaticus,* que é termoestável, podendo aguentar altas

temperaturas, sendo assim, não havia necessidade de se acrescentar de mais enzimas a cada processo do ciclo de desnaturação. (POTY, 2011).

A sua técnica consiste na fragmentação de uma amostra de DNA, utilizando a DNA polimerase, uma enzima produzida pelo organismo vivo e que faz a replicação do material genético das células. (NOVAIS, ALVES, SILVA, 2004).

A PCR envolve três etapas: a desnaturação: a fitas de DNA são desnaturadas pelo aumento da temperatura entre 94-95 °C, separando as fitas e anelando os primers (indicador molecular, que marca a sequência do DNA que é necessário sintetizar) no sentido do alvo da fita simples. (SANTIAGO, VENERONI, REGITANO, 2017).

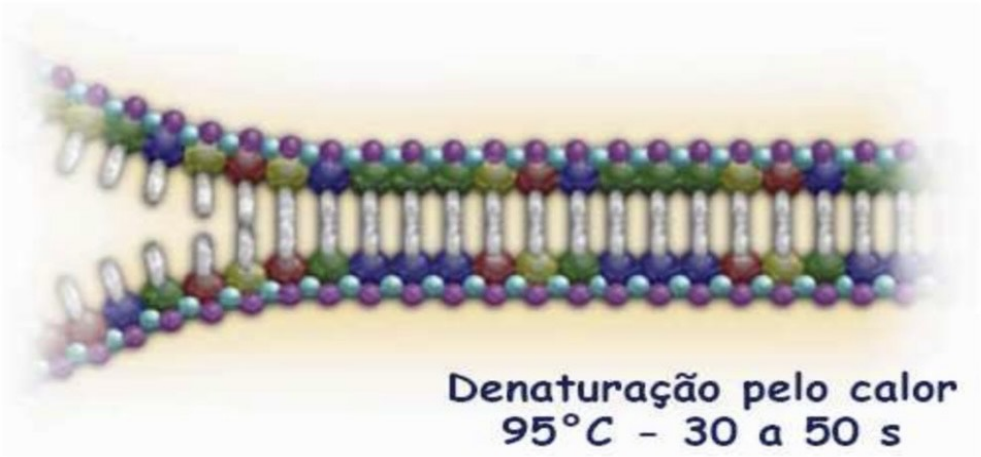

Figura 1: desnaturação da fita dupla de DNA. (OLIVEIRA, 2011).

Hibridização: o ligamento dos primers indicadores na região alvo da fita complementar do DNA se anelam à 60°C. (OLIVEIRA, 2011).

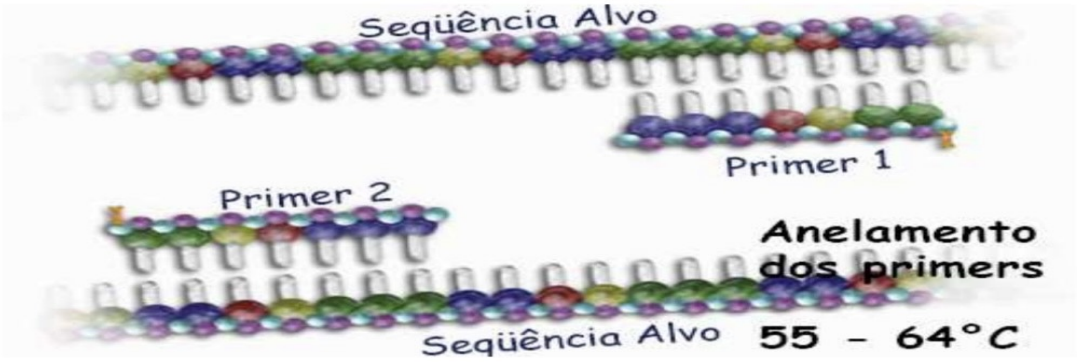

Figura 2: anelamento dos primers na sequência alvo.(OLIVEIRA, 2011).

Extensão: uma etapa de extensão dos primers ligados por uma DNA polimerase termoestável, sendo utilizada a enzima da bactéria taq (termus aquaticus). (SANTIAGO, VENERONI, REGITANO, 2017).

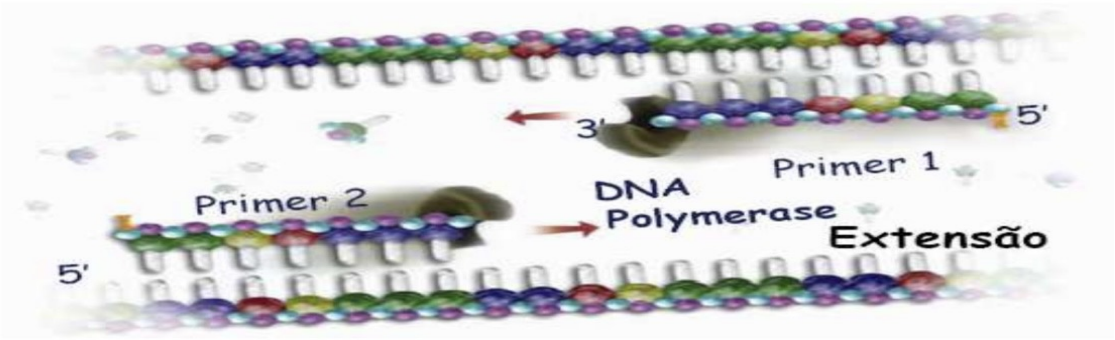

Figura 3: extensão pela taqpolimerase (OLIVEIRA, 2011).

É necessário alguns componentes para que a PCR ocorra: A presença da DNA polimerase, como por exemplo a taq (termus aquaticus).um par de primers oligonucleotídeos para iniciar as reações de cátions divalentes MgCl2; Os deoxinucleotídeos trifosfatados (nucleotídeos do DNA) que são formados por bases nitrogenadas: adenina, citosina, guanina, timina, também conhecidos por dNTPs, são colocados na mesma quantidade de dATP; (desoxiAdenosina Trifosfatada), dCTP; (desoxiCitidina Trifosfatada), dTTP; (desoxiTimidina Trifosfatada), dGTP;(desoxiGuanosina Trifosfatada). Uma amostra de DNA molde, podendo ser fita simples ou fita dupla. (SANTIAGO, VERERONI, REGITANO, 2017)

Um tampão que realiza as cópias dos segmentos de DNA e faz a manutenção do pH (potencial hidrogeniônico) normalmente entre 8,3 a 9 à

temperatura ambiente. (SANTIAGO, VENERONI, REGITANO, 2017). Á repetição dessas etapas podem gerar cerca de 20 a 30 ciclos permitindo a amplificação de um fragmento específico de DNA. (POTY, 2011).

Essa técnica revolucionou a biologia molecular, possibilitando a facilidade e rapidez de diagnósticos e na manipulação de ácidos nucléicos, podendo ser utilizada na detecção de mutações ou doenças genéticas (NOVAIS, ALVES, SILVA, 2004).

4.3 Meningite Viral

Meningite Asséptica é o termo utilizado para diagnosticar um conjunto de manifestações clínicas (SANTOS, 2012.). É a principal síndrome que afeta o sistema nervoso central, sendo a meningite viral do gênero enterovírus a maior em casos notificados. (ALVES et, al, 2015.)

Os gêneros Enterovírus (EVS), é pertencente à família Picornaviridae, sendo composta por mais de 100 sorotipos virais, onde a maioria pode causar doenças em humanos. A sua região codificante é dada pelas regiões não traduzidas nas extremidades 5´ e ´3. (MACHADO, Et al, 2016). Dentro do grupo do gênero enterovírus estão incluídos as 3 cepas dos polivírus, 28 cepas de echovírus, 23 cepas do vírus coxsackie A, 6 vírus coxsackie B e 5 e outros enterovírus (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE/MS). Na Tabela abaixo, pode ser vista com base na análise molecular do genoma viral, que existem o grupo enterovírus humanos (HEV) em sete espécies:

TABELA 1- Classificação dos Enterovírus Humanos Baseada na Análise do Genoma Viral

Enterovírus humanos A (HEV-A)	Enterovírus humanos B (HEV-B)	Enterovírus humanos C (HEV-C)	Enterovírus humanos D (HEV-D)	Rhinovírus humanos A (HRV-A)	Rhinovírus humanos B (HRV-B)	Rhinovírus humanos C (HRV-C)
CVA2-A8	CVB1-B6	PV1	EV68	HRV1-2	HRV3-6	HRVA2 OU
CVA10	CVA9	PV2	EV70	HRV7-13	HRV14	HRVC
CVA12	E1-7	PV3	EV94	HRV15-16	HRV17	
CVA14	E9	CVA1	EV111	HRV18-25	HRV26-27	
CVA16	E11-21	CVA11		HRV28-34	HRV35	
EV71	E24-27	CVA13		HRV36	HRV37	

EV76	**E29-33**	**CVA15**		**HRV38-41**	**HRV42**	
EV89	**EV69**	**CVA17-22**		**HRV43-47**	**HRV48**	
EV90	**EV73**	**CVA24**		**HRV49-51**	**HRV52**	
EV91	**EV74**	**EV95-96**		**HRV53-68**	**HRV69-70**	
EV114	**EV75**	**EV99**		**HRV71**	**HRV72**	
	EV77	**EV102**		**HRV73-78**	**HRV79**	
	EV78-88	**EV104**		**HRV80-82**	**HRV83-84**	
	EV93	**EV105**		**HRV 85**	**HRV86**	
	EV97-98	**EV109**		**HRV88-90**	**HRV91-93**	
	EV100-101	**EV113**		**HRV9496**	**HRV97**	
	EV106-107	**EV116**		**HRV98**	**HRV99**	
	EV110			**HRV100**		

Fonte: Autoria própria com base no artigo de (Santo, 2012)

A sua característica é a inflamação das finas membranas leptomeníngeas-dura mater, aracnoide e pia mater, que envolvem o cérebro e a medula espinhal. Os sintomas das meningites (viral ou bacteriana) são semelhantes, em ambas podem aparecer: cefaleia, febre e rigidez de nuca, podendo vir acompanhada de náuseas e vômitos podendo haver convulsão ou perda do nível de consciência e sinais neurológicos focais. Geralmente, a meningite viral evolui de forma benigna, sendo apenas necessário o suporte clinico para sintomatologia. (RIBEIRO, 2015).

O rastreamento para o diagnóstico da meningite é analisado através do líquido cefalorraquidiano (LCR) ou líquor em exames laboratoriais. (SANTOS, 2012). Os achados vão variar de acordo com a idade do paciente, porém, são mais comuns em crianças com menos de 5 anos, especificamente em crianças de 1 ano, causando um quadro mais grave da infecção. (RODRIGUES et al, 2015).

4.4. Dados epidemiológico das meningites no Brasil

A meningite viral, é a forma mais comum e menos perigosa da doença, entretanto é a de maior número de casos confirmados no mundo (MACHADO, et al 2016). As meningites bacterianas, por sua vez, têm uma alta taxa de mortalidade e morbilidade em todo o mundo. Os agentes etiológicos das meningites podem ser: vírus, bactérias, fungos, parasitas e entre outros (PEREIRA et al, 2010).

Os dados epidemiológicos das meningites no brasil, foram dados através do Ministério da Saúde, entre os anos de 2017 até 2022.

Casos confirmados de meningite, por etiologia, Brasil, 2017-2022.

Etiologia	2017	2018	2019	2020	2021	2022	Total
Doença meningocócica	1.138	1.133	1.062	383	263	272	4.251
Meningite tuberculosa	444	357	346	270	275	179	1.871
Meningite por outras Bactérias	2.695	2.809	2.398	1.317	1.331	1.032	11.582
Meningite não especificada	2.812	2.545	2.626	1.502	1.450	1.272	12.207
Meningite viral	7.930	8.765	8.253	3.072	2.572	2.059	32.651
Meningite por outras etiologias	802	744	710	503	560	336	3655
Meningite por *h.influenzae*	130	149	168	32	62	88	629
Meningite pneumocócica	1.031	1.047	1.072	343	377	601	4471
Total	**16.982**	**17.549**	**16.635**	**7.422**	**6.890**	**5.839**	**71.317**

Figura 4: dados epidemiológicos do brasil entre 2017-2022. (MINÍSTERIO DA SAÚDE)

A observação feita entre os anos de 2021 e 2022 é que ouve um aumento no número de casos das meningites, meningocócica, *Haemophilus influenzae* e pneumocócica. As meningites bacterianas também são denominadas de piogênica, pode gerar diversas sequelas no sistema nervoso. Os agentes etiológicos que mais acometem são os: *Streptococcus* do grupo B e os bacilos gram-negativos, são encontrados em neonatos com maior frequência, o *Haemophilus influenzae* em crianças de até 5 anos de idade é o agente predominante, enquanto crianças acima de 5 anos o microrganismo majoritário é a *Neisseria meningitidis* (FONSECA et al, 2010). As meningites bacterianas devem ser vistas como emergência médica e rápido diagnóstico, para evitar as sequelas trazidas pela doença (PEREIRA, 2014).

Os exames clínicos, são de extrema importância, portanto devem ser selecionados os principais para o resultado preciso. A biologia molecular vem se destacando em meios laboratoriais, devido as suas maiores chances de certeza aos resultados, entre elas a PCR em tempo real é uma modificação da técnica da PCR tradicional, que distingui o DNA alvo com maior sensibilidade e especificidade em um menor tempo da reação. (SANTIAGO, VENERONI, REGITANO, 2017).

4.6. PCR em tempo real, para o diagnóstico e diferenciação das meningites

A PCR em tempo real é uma modificação da técnica da PCR tradicional, que evidência o DNA alvo com maior sensibilidade e especificidade em um menor tempo da reação (SANTIAGO, VENERONI, REGITANO, 2017). A qPCR

(Real-Time PCR) é um método semi-quantitativo, atualmente existem técnicas que podem ser vendidas em kits comerciais, e a sua manipulação em laboratório requer de um termociclador, juntamente a um sistema ótico que aumenta o nível de fluorescência. As análises são feitas a partir de software de computadores, essas tecnologias estão disponíveis no mercado, sendo os mais utilizados o: SYBR Green (agente intercalante do DNA) e o TaqMan (sistema para possibilitar a detecção de algo específico da PCR) (HASS,TORRES, 2016).

A reação da transcrição reversa, técnica feita antes do processo da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) possui inicialmente um molde da molécula de RNA, gerando a cDNA (DNA complementar) a partir de desoxirribonucleotídeos trifosfatos. O início da transcrição reversa ocorre geralmente em temperatura a 420C, e entre 30 a 60 minutos (SUAREZ, 2010).

5. Resultados

A partir de revisões literárias, foi obtido resultados da técnica de PCR em tempo real, para diagnósticos de meningites, com ênfase em meningite viral. O processo de validação do ensaio, foram selecionadas 616 amostras de LCR de pacientes com meningite. Essas amostras foram armazenadas em freezer a -70 C, e o RNA foi extraído diretamente do líquido cefalorraquidiano utilizando-se o kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Foi utilizado o sistema “TaqMan RT-qPCR assay” para efetuar o ensaio RT-qPCR. A reação foi realizada empregando os primers para o gênero EV da meningite, que apresentam a região conservada 5’ não traduzida dos EVs (5’NTR) como alvo de detecção. Os primers senso utilizados foram: o 5’-CCCTGAATGCGGCTAATCC-3’ anti-senso 5’-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3’ e probe FAM 5’-AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-3’ BHQ. Foi extraído 5 µL do RNA viral e o volume total de 25 µL (MACHADO et al, 2016).

As análises destes dados gerados na curva padrão, foi observado a eficiência de amplificação de 99,80 %. A curva padrão de eficiência do ensaio de RT-qPCR está apresentada na Figura 5 e figura 6, B (MACHADO et al, 2016).

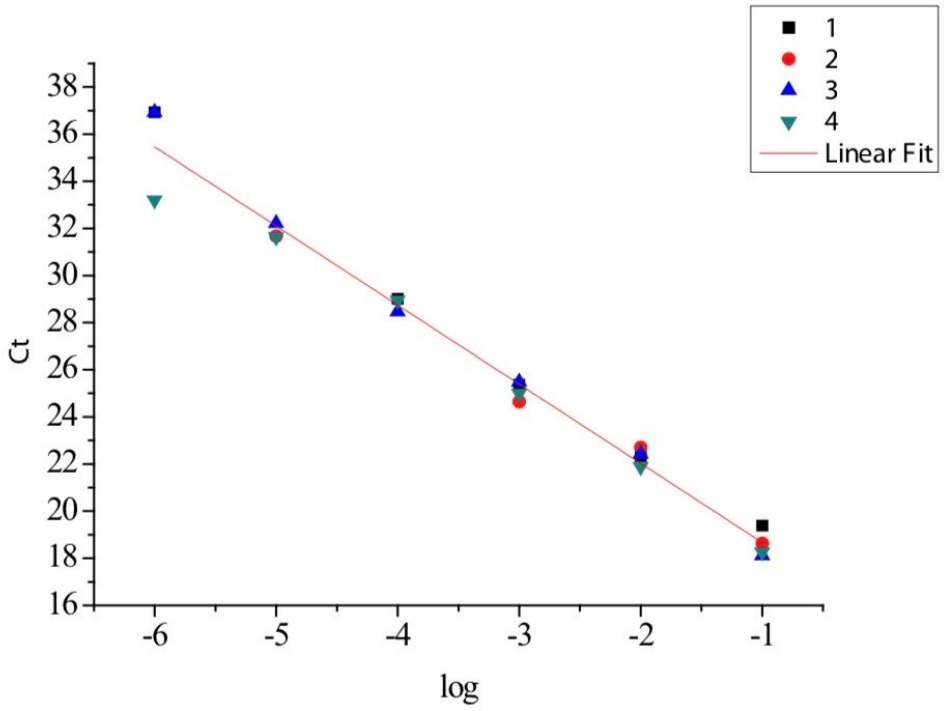

Figura 6. Curva de padrão de eficiência do ensaio da RT-qPCR. (MACHADO, Et, al, 2016).

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 *Kappa*	0,78	--

Figura 7. Parâmetros avaliados no processo de validação e os resultados obtidos. (MACHADO Et, al, 2016).

6. Conclusão

Diante os resultados das técnicas da PCR convencional e PCR em tempo real, o diagnóstico laboratorial para diferenciação e detecção da meningite viral em específico, é de grande probabilidade e especificidade, sua sensibilidade e

variedade da técnica permite a avaliação mais precisa do genoma do vírus da meningite viral do gênero enterovírus. A finalidade da técnica resulta na amplificação e reprodução do material genético ali analisado, diminuindo os riscos de erros e dificuldade de distinguir não só a tipologia do vírus, como a codificação do RNA do vírus EV. Com isso, a PCR se consolida a técnica ouro da biologia molecular e mapeamento de doenças virais ou infecciosas.

REFERÊNCIAS

ALVES, Emanuele Amorim; SOUZA, Daniel Santos. Biologia molecular: História da biologia molecular. In: ALVES, Emanuele Amorim; SOUZA, Daniel Santos; MOLECULAR, Biologia. Biologia molecular: História da biologia molecular. São Paulo: Abas, 2008. Cap. 2. p. 1-53. Antônio Carlo Batalini Brandão**.**

Alves, et al, 2016. Parâmetros laboratoriais do líquido cefalorraquidiano em indivíduos com meningite por enterovírus**.** Acesso em: 18 nov. 2016.

MACHADO, Bráulio Caetano et al. Avaliação do desempenho da PCR em tempo real para o diagnóstico de meningite por Enterovirus. Rev Inst Adolfo Lutz, São Paulo, p. 1-6, 2016. Disponível em: https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1021326. Acesso em: 08 maio 2020.

HEPP, Diego; NONOHAY, Juliana Schmitt de. A importância das técnicas e análises de DNA. Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do Ifrs, Porto Alegre, v. 3, p. 114-124, 2016.

Albert. Situação Epidemiológica das Meningites no Brasil. Brasília**:** Albert, 2022. 31 p. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/meningite/publicacoes/situacao-epidemiologica-das-meningites-no-brasil-2022.pdf. Acesso em: 07 nov. 2022.

NOVAIS, Caroline Monteiro; PIRES-ALVES, Melissa. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (pcr). Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, S.l., v. 1, n. 33, p. 10-13, jul. 2004.

OLIVEIRA, Priscilla Lima de. USO DA PCR EM TEMPO REAL PARA DETERMINAR A FREQUÊNCIA DOS PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DAS MENINGITES BACTERIANAS EM AMOSTRAS CLÍNICAS RECEBIDAS PELO INSTITUTO ADOLFO LUTZ NO PERÍODO DE JANEIRO A SETEMBRO DE 2010. 2010. 87 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Imunologia e Biologia Molecular, Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz São Paulo - Sp, São Paulo, 2010.

PEREIRA, Diana Nogueira. MENINGITES BACTERIANAS. 2014. 79 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

RIBEIRO, Victor Hugo de Oliveira. Meningite viral: aspectos clínicos e epidemiológicos de casos suspeitos atendidos em hospital de referência do Estado da Bahia (Brasil). 2015. 74 f. Monografia (Doutorado) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RODRIGUES, Erick de Miranda Bento. MENINGITE: perfil epidemiológico da doença no brasil nos anos de 2007 a 2013**.** 2015. 16 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biomedicina, Uniceub, Brasília, 2015.

RODRIGUES, Rodrigo Douglas *et al*. MENINGITES NA INFÂNCIA: ABORDAGEM INICIAL. Disponível em: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/04/883019/35-meningites-na-infancia.pdf. Acesso em: 25 maio 2021.

SANTIAGO, Adelita Carolina; VENERONI, Gisele Batista; REGITANO, Luciana Correia de Almeida. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR). Protocolos de Biologia Molecular Aplicadas à Produção Animal, Aaaaaa, p.14-1 SENNE LIQUOR DIAGNÓSTICO. O diagnóstico das Meningites Virais (PCR) Potenciais benefícios assistenciais e econômicos. Vitrine Científica, São Paulo, v. 1, n. 188, p.1-1, jan. 2010.

SENNE LIQUOR DIAGNÓSTICO. O diagnóstico das Meningites Virais (PCR) Potenciais benefícios assistenciais e econômicos. Vitrine Científica**,** São Paulo, v. 1, n. 188, p.1-1, jan. 2010.

REVISTA SAÚDE PÚBLICA. São Paulo: Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória do Centro de Vigilância Epidemiológica. Prof. Alexandre Vranjac. 2006. Meningites Virais.

TORRES, Dionei Joaquim Haas e Ana Caroline Doyle. APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS DE PCR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS DOS ANIMAIS. 2016. 15 f. Tese (Doutorado) - Curso de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

POTY, Igor de Oliveira**.** REVISÃO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DO DNA PARA COMPREENSÃO DAS TÉCNICAS DE PCR E PCR EM TEMPO REAL E SUA APLICABILIDADE NA PESQUISA DE MICROORGANISMOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**.** 2011. Disponível em: https://bdm.unb.br/bitstream/10483/3351/1/2011_IgordeOliveiraPoty.pdf. Acesso em: 26 mar. 2021.

FREITRAS, Katherine Valença. AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE PACIENTES COM MENINGITE: DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE MENINGITE BACTERIANA E VIRAL. Disponível em: https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/avaliacao-laboratorial#google_vignette. Acesso em: 26 out. 2023.