

COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE IMUNOFLUORESCENCIA INDIRETA E PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS

COMPARISON OF IMMUNOFLUORESCENCE AND MULTIPLEX PCR FOR RESPIRATORY VIRUS DETECTION

Título resumido: Comparação metodologias para vírus respiratórios.

Categoria: Artigo Original

Caroline Carvalho Minali ¹,
Maria do Carmo Debur ²,
Lilian Pereira Ferrari ³.

RESUMO

Os vírus respiratórios são os principais agentes etiológicos de surtos de infecções do trato respiratório que acometem todas as faixas etárias. Deste modo há a necessidade de um sistema de vigilância epidemiológica efetivo para o monitoramento das síndromes respiratórias agudas e o diagnóstico laboratorial é de extrema importância para se identificar de maneira rápida e sensível o agente etiológico envolvido. O objetivo deste estudo foi comparar as metodologias e os resultados obtidos pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) com o kit *Vírus Panel IFA* (Biotrin) e PCR multiplex com o kit *RV12 ACE Detection* (Seegene) nas amostras de aspirado de nasofaringe (ANF) recebidas no Lacen/PR do Programa de Vigilância Epidemiológica do Vírus Influenza do Ministério da Saúde (SIVEP-Gripe) no ano de 2011. Foram recebidas no Lacen/PR 295 amostras de ANF, sendo analisadas 286 amostras por IFI e 284 amostras por PCR. A IFI levou 4 horas para concluir o resultado da pesquisa de 7 vírus (AdV, FLU A, FLU B, PIV 1, PIV 2, PIV 3 e RSV) e a PCR levou 6 horas para determinar o resultado da pesquisa de 12 vírus respiratórios (AdV, FLU A, FLU B, PIV 1,

92

PIV 2, PIV 3, RSV A, RSV B, hCoV 229E, NL63, HKU1 e OC43, hRV A/B, hMPV). A IFI detectou vírus em 24% das amostras enquanto que o PCR em 48%. A comparação dos resultados obtidos por ambas as metodologias mostrou concordância de 98%, no entanto o método de PCR mostrou-se mais sensível que a técnica de IFI. Diante dos resultados obtidos, a metodologia de PCR mostrou benefícios para o monitoramento de vírus respiratórios do Programa SIVEP- Gripe, pela fácil interpretação dos resultados e pela pesquisa adicional de 5 vírus respiratórios.

Descritores: vírus respiratórios; diagnóstico laboratorial; reação em cadeia da polimerase; imunofluorescência indireta.

ABSTRACT

Respiratory viruses are the main etiological agents of respiratory infections outbreaks that attack all the age groups. In this way, a surveillance epidemiological system must be effectively for the respiratory syndromes monitoring and the laboratory diagnostic is important in order to identify the etiological agent. The objective of this study was to compare the methodologies and the results obtained by the techniques of indirect immunofluorescence (IFI) and kit Virus Panel IFA (Biotrin, Dublin, Ireland) and PCR multiplex with the kit RV12 ACE Detection (Seegene, Seoul, South Korea) in the samples of nasopharyngeal aspirate (ANF) received in the Lacen/PR of the Surveillance of Influenza virus of the Health Ministry (SIVEP-Gripe) in the year of 2011. 295 samples of ANF were received in the Lacen/PR, 286 samples were analysed by IFI and 284 samples by PCR. The IFI determined in 4 hours the results of 7 viruses (AdV, FLU A, FLU B, PIV 1, PIV 2, PIV 3 and RSV) and the PCR determined in 6 hours the results of 12 respiratory viruses (AdV, FLU A, FLU B, PIV 1, PIV 2, PIV 3, RSV A, RSV B, hRV A/B, hMPV, hCoV 229E, NL63, HKU1 and OC43). The IFI detected virus in 24 % of the samples whereas the methodology of PCR in 48 % of the samples. The comparison of the results of both methodologies showed agreement of 98 %. The method of PCR appeared more sensitive than the technique of IFI. The methodology of PCR showed benefits for the monitoring of respiratory viruses for SIVEP - Gripe, for the easy interpretation of the results and the possibility of investigate more respiratory viruses than IFI.

Descriptors: respiratory virus; laboratory diagnostic; polymerase chain reaction; indirect immunofluorescence.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as infecções do trato respiratório têm sido relacionadas globalmente com doenças agudas que atingem todas as faixas etárias, contribuindo para um alto índice de morbidade e mortalidade, principalmente em indivíduos idosos, crianças e pacientes imunossuprimidos. Estas infecções são causadas por uma variedade de microorganismos, sendo que os vírus são os agentes mais prevalentes^(1,2).

Em adultos, os vírus respiratórios apresentam um papel importante na etiologia das pneumonias adquiridas na comunidade, sendo também os principais agentes envolvidos na exacerbação da doença pulmonar obstrutiva crônica e da asma, responsáveis por significativo número de consultas clínicas e hospitalizações⁽³⁾. Atualmente observa-se um aumento do número de estudos realizados para a investigação destes agentes em pacientes criticamente doentes, no entanto ainda são escassas as informações sobre estes na população brasileira⁽⁴⁾.

Em pacientes pediátricos, a infecção por vírus respiratórios é a principal causa de morbidade e de uso da estrutura de atendimento de saúde, resultando em um substancial custo para a família e para a sociedade^(5,6). Estas infecções são responsáveis por 1 a 3% de mortalidade entre crianças menores de 5 anos de idade em países industrializados e por 10 a 15% de óbitos em crianças de países em desenvolvimento⁽⁶⁾. Neste grupo de pacientes, assim como em idosos e outros pacientes imunossuprimidos, os vírus respiratórios podem causar sérias complicações clínicas, como crupe, bronquiolite e pneumonias, as quais frequentemente requerem hospitalização⁽⁷⁾.

No Brasil, alguns estudos realizados em diferentes áreas geográficas, tem revelado os agentes virais como a principal causa de infecção respiratória aguda, principalmente em crianças, como observado nas cidades de Fortaleza⁽⁸⁾, Rio de Janeiro⁽⁹⁾, São Paulo⁽¹⁰⁾ e Curitiba⁽⁴⁾. Entretanto, informações sobre a prevalência dos vírus em crianças de outras regiões ainda são escassas^(8,11). De acordo com levantamentos da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Paraná, tem-se uma média anual de 118.467 pacientes internados por doenças do aparelho respiratório, em diferentes faixas etárias, sendo a pneumonia com causa desconhecida a doença de maior incidência. A porcentagem anual de mortalidade proporcional foi de 2,05%, segundo dados levantados em 2011⁽¹²⁾.

Os agentes etiológicos virais mais frequentes envolvidos com as infecções do trato respiratório (ITR) são os vírus influenza tipo A (FLU A) e tipo B (FLU B), adenovírus (AdV),

vírus sincicial respiratório (RSV), vírus parainfluenza (PIV) tipos 1, 2, 3, 4A e 4B, coronavírus humano (hCoV) tipos 229E, NL63, HKU1 e OC43, rinovírus (hRV) tipos A, B e C e metapneumovírus humano (hMPV). Estes vírus são responsáveis por um espectro de manifestações clínicas que incluem o comprometimento alto e baixo do trato respiratório⁽⁶⁾. Contudo, os agentes causadores de uma significativa parcela das infecções respiratórias ainda são desconhecidos.

Visando a detecção e prevenção de uma pandemia pelo vírus influenza, o Brasil desde o ano 2000 implantou diversas medidas para contenção da disseminação de cepas altamente virulentas. Dentre estas medidas está a vigilância laboratorial das infecções respiratórias virais e a imunização da população de maior risco de doença. Neste programa de vigilância foi possível definir laboratorialmente, por meio da técnica de imunofluorescência indireta (IFI), a etiologia da ITR em aproximadamente 30% dos casos. Contudo, foram pesquisados apenas 7 vírus respiratórios (PIV 1, PIV 2, PIV 3, AdV, RSV, FLU A e FLU B)⁽³⁾.

Um sistema de vigilância epidemiológica efetivo para o monitoramento de surtos de Síndrome respiratória aguda deve ser capaz de identificar oportunamente a circulação de um novo agente com potencial epidêmico/pandêmico. Deste modo, o diagnóstico laboratorial é de extrema importância e a metodologia utilizada necessita ser rápida, sensível e capaz de detectar, a princípio, todas as variantes dos subtipos virais⁽¹³⁾.

O objetivo deste estudo foi comparar as metodologias e os resultados obtidos pelas metodologias de imunofluorescência indireta com o *kit Respiratory Virus Panel IFA* (Biotrin, Dublin, Ireland) e PCR *multiplex* com o *kit RV12 ACE Detection* (Seegene, Seul, Coreia do Sul) das amostras recebidas no Laboratório Central do Estado do Paraná (Lacen/PR) no ano de 2011 para o Programa de Vigilância Epidemiológica do Vírus Influenza (SIVEP- Gripe) do Ministério da Saúde (MS).

METODOLOGIA

Amostras

As coletas das amostras de Aspirado de Nasofaringe (ANF) foram realizadas nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) do Cajuru e do CIC, considerados postos sentinelas para o SIVEP-Gripe. Os pacientes atendidos nestas UBS que apresentavam sintomas de febre acompanhado de pelo menos uma manifestação clínica respiratória (tosse, dispnéia, respiração ruidosa, dor de garganta) e uma sistêmica (otalgia, mialgia, dor de cabeça) com

início a não mais de 5 dias da data da coleta, eram convidados a participar do Programa, sendo então coletada a amostra do trato respiratório.

Coleta das amostras respiratórias

A aspiração foi realizada com Bomba Aspiradora Portátil, coletor plástico de secreções, acoplado em uma sonda uretral nº6. Durante a coleta, a sonda foi inserida através da narina até atingir a região da nasofaringe quando então o vácuo foi aplicado aspirando aproximadamente 1 mL de secreção para o interior do coletor. Este procedimento foi realizado em ambas as narinas, mantendo movimentação da sonda para que evitasse pressão diretamente sobre a mucosa e sangramento. Após a coleta, o Meio de Transporte Viral (MTV) foi aspirado para dentro do coletor plástico de secreções.

As amostras assim coletadas foram armazenadas à 4°C e encaminhadas ao LACEN/PR em um período não superior a 24 horas.

Processamento das amostras

As amostras logo que chegaram ao LACEN/PR foram imediatamente processadas. O ANF em MTV foi centrifugado durante 10 minutos a 1.500 RPM. Aproximadamente 2 mL do sobrenadante foi separado para os testes de biologia molecular (*kit RV12 Ace Detection*) e armazenado em freezer -70°C até a sua utilização. O sedimento foi lavado com Tampão Fosfato pH 7,2 (PBS) e o muco retirado com pipeta Pasteur. As células foram suspensas em 0,1-0,2mL de PBS e depositadas sobre lâminas de vidro com 8 poços demarcados (sendo um para cada vírus a ser pesquisado), secado ao ar, fixadas em acetona à 4°C por 10 minutos e analisadas por meio do ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) com o *ki Respiratory Virus Panel IFA*- Biotrin.

Imunofluorescência indireta com o *kit Respiratory Virus Panel IFA* (Biotrin, Dublin, Ireland)

Os poços da lâmina foram demarcados com esmalte de modo a evitar o extravasamento dos anticorpos da reação de IFI. Em cada orifício foi adicionado 40µL do anticorpo monoclonal correspondente ao vírus a ser detectado (FLU A, FLU B, RSV, AdV, PIV 1, PIV 2 ou PIV 3) e no poço de controle negativo 40 µL do anticorpo *normal mouse*. A

lâmina foi incubada a 37°C/30 minutos em câmara úmida e após mergulhada no Tampão PBS/Tween 20/Azida de sódio por 10-15 segundos. Sem deixar a lâmina secar, foi adicionado em todos os poços 10 µL do anticorpo do conjugado (anti Ig cobaio + fluoresceína), incubado por 37°C/30 minutos em câmara úmida e mergulhada novamente por 10-15 segundos no Tampão PBS/Tween 20/Azida de sódio. Sem deixar a lâmina secar foi colocado 1 gota de glicerol tamponado (pH 8,2) em todos os poços e após adicionado a lamínula. A leitura da fluorescência foi realizada no microscópio de Epifluorescência Leica DM 1000, a 100-200x, e os detalhes visualizados no aumento de 400x.

O padrão de coloração típico exibido para os vírus infecciosos foi observado conforme descrito abaixo ⁽¹⁴⁾:

- AdV: Fluorescência verde brilhante no núcleo, citoplasma ou em ambos. A coloração nuclear é uniformemente brilhante com pouca definição. A coloração citoplasmática é geralmente pontual.
- FLU A e FLU B: Fluorescência verde brilhante no núcleo, citoplasma ou em ambos. A coloração nuclear é uniformemente brilhante com pouca definição. A coloração citoplasmática é geralmente pontual com grandes inclusões.
- PIV 1, 2 e 3: Fluorescência verde brilhante somente no citoplasma. A coloração citoplasmática é geralmente pontual com inclusões irregulares.
- RSV: Fluorescência verde brilhante no citoplasma. A coloração citoplasmática é geralmente pontual com pequenas inclusões.
- Células negativas: As células coradas apresentam-se avermelhadas no citoplasma e castanho quase preto no núcleo. A coloração dessas células é devido a presença do contraste Azul de Evanz.

A amostra foi considerada positiva para presença de vírus no caso de observação de pelo menos 2 células ou mais com fluorescência verde brilhante em campo de observação de 400x.

Reação de RT-PCR com o kit *RV12 Ace Detection* (Seegene, Seul, Coréia do Sul)

Extração do material genético

A extração foi realizada no equipamento *Nuclisens EasyMAG* (BioMérieux, Boxtel,

The Netherlands). Os ácidos nucleicos totais foram extraídos de 200µL do ANF que foram adicionados a 2 mL do Tampão de Lise e incubado por pelo menos 10 minutos antes de ser levado ao equipamento. O protocolo de extração foi o *Generic 3.0.1*, com lise fora do equipamento “*off board*” e 100µL do mix de sílica. Os ácidos nucleicos extraídos foram eluídos em 60µL do Tampão de Eluição do equipamento e armazenados à -70°C até a sua utilização nos testes moleculares. O controle da extração foi a detecção do gene da *RNase P*, conforme descrito pelo protocolo do CDC (2009) para o diagnóstico laboratorial do influenza A/H1N1 pandêmico 2009 por PCR em tempo real⁽¹⁵⁾.

Transcrição Reversa (RT)

O RNA extraído foi utilizado para a síntese do cDNA com o *kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (Fermentas Life Sciences, EU)*, conforme recomendações do fabricante. Como controle dessa reação, utilizou-se um RNA de vírus já conhecido. No mix contendo 0,5µL de oligonucleotídeos randômicos e 1,5µL de água livre de nucleases foi adicionado 4µL do ácido nucleico extraído. A mistura foi incubada por 3 minutos a 80°C e após resfriada em banho de gelo. Adicionou-se 2µL de *Buffer RT 5X*, 1µL de dNTP 10mM, 0,5µL da enzima *Rnase inhibitor (inibidor de Rnase)* (20U/ µL) e 0,5 µL da enzima *Reverse Transcriptase (transcriptase reversa)* (200U/ µL) à mistura e incubou-se por 90 minutos a 37°C para transcrição reversa, seguida de inativação enzimática à 94°C por 2 minutos. O cDNA assim produzido foi armazenado em freezer -20°C até a sua utilização.

Reação da Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a reação de PCR foi utilizado o *kit RV12 Ace Detection* que detecta 11 tipos de vírus respiratórios de RNA e 1 tipo de vírus respiratório de DNA em um sistema de 2 reações hexaplex (RV A e RV B) por amostra. No RV A são detectados os vírus: Adv, hCoV 229E/NL63, hMPV, PIV tipos 1, 2 e 3. No RV B são detectados os vírus: hCoV OC43/HKU1, FLU A, FLU B, hRV A/B e RSV A e B. Um controle interno (DNA plasmidial) foi adicionado ao mix de primers para validar o processo de amplificação, sendo possível nestes casos identificar amostras que contenham interferentes para a reação de PCR. Adicionalmente, no *kit* foi incluído uma amostra positiva e uma negativa para todos os vírus pesquisados. A reação foi conduzida conforme recomendações do fabricante. A reação de PCR foi realizada em um

volume final de reação de 11,5µL, contendo: 2µL de mix de primers (5X *RV12 ACE PM*), 1,5 µL *8-MOP solution*, 5µL de *2X Multiplex Master Mix* e 3µL do cDNA ou DNA. A termociclagem foi conduzida por 94°C por 15 minutos para ativação enzimática, seguida de 35 ciclos de amplificação de (94°C por 30 segundos, 60°C por 90 segundos e 72°C por 90 segundos) e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Detecção

O produto da reação de PCR foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose à 1,5% (Sigma Chemical) em tampão de corrida: TBE 1X (Tri-borato 0,09M e EDTA 0,002M) (Gibco BRL) pH 8,0 + 0,1µl de brometo de etídio (10mg/ml), e visualizados sob luz ultravioleta.

Foi utilizado na corrida eletroforética, juntamente com as amostras, controle positivo e negativo da reação, um marcador de massa molecular com o mesmo tamanho do produto de PCR do controle interno e dos seis vírus pesquisados em cada hexaplex, presente no *kit*. A corrida desenvolveu-se a 100 V/cm, por aproximadamente 45 minutos.

Consideraram-se as reações de PCR onde os controles positivos e negativos da reação mostraram resultados satisfatórios. As amostras que apresentaram produto de PCR do mesmo tamanho que uma banda do marcador do *kit* foram consideradas positivas para o respectivo vírus. As amostras que apresentaram apenas a banda do controle interno foram consideradas negativas.

Análise dos dados

A análise dos resultados obtidos com a execução das metodologias de IFI e PCR foram realizados a partir dos registros de análises dos laboratórios de Biologia Molecular e Vírus Respiratórios do LACEN/PR no ano de 2011, bem como relatórios epidemiológicos retirados do Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) do Lacen/PR.

Os resultados foram comparados quanto à concordância dos resultados obtidos em ambas as metodologias, bem como calculados os valores de sensibilidade e especificidade para cada técnica.

Comitê de ética

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética da Faculdade Integradas do Brasil (Unibrasil) e aprovado sob número 02840312.3.0000.0095.

RESULTADOS

Foram recebidas no LACEN/PR 295 amostras de ANF do SIVEP-Gripe no ano de 2011, sendo que 164 (164/295 - 55,6%) foram coletadas na UBS Cajuru e 131 (131/295 - 44,4%) foram coletadas na UBS CIC. As UBS atingiram a meta de coleta em 33 (33/52 - 63,46%) semanas epidemiológicas, apesar da coleta ter sido iniciado apenas na semana nº17 (24 a 30/04/2011), conforme demonstrado na Figura 1.

Foram analisadas 286 (286/295 - 96,94%) amostras por IFI com o *kit Respiratory Virus Panel IFA* (Biotrin, Dublin, Ireland) e 284 (284/295 - 96,27%) amostras por PCR com o *kit RV12 ACE Detection* (Seegene, Seul, Coréia do Sul). As amostras descartadas estavam vazadas ou eram insuficientes.

Pela metodologia de IFI, detectou-se 68 (68/286 - 23,77%) amostras positivas e 218 (218/286 - 76,22%) amostras negativas. Pela metodologia de PCR detectou-se 136 (136/284 - 47,88%) amostras positivas e 148 (148/284 - 52,11%) amostras negativas. A Figura 1 demonstra a comparação dos resultados obtidos pelas duas metodologias por semana epidemiológica do ano de 2011 nas amostras analisadas.

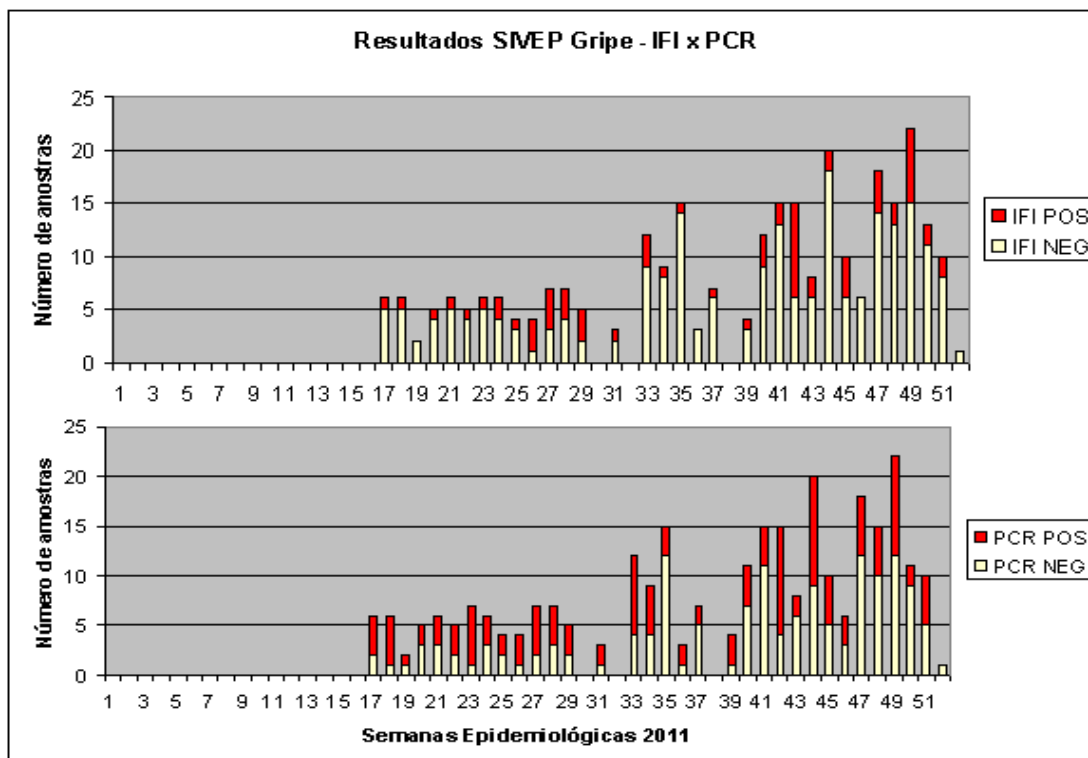


Figura 1: Resultados obtidos pelas metodologias de IFI (*kit Respiratory Vírus Panel IFA - Biotrin*) e PCR (*kit RVI2 ACE Detection - Seegene*) nas amostras do SIVEP-Gripe recebidas no ano de 2011 em Curitiba (PR).

A metodologia de IFI detectou vírus respiratórios em 24% das amostras recebidas pelo SIVEP-Gripe, sendo que o FLU A (9%) e FLU B (5%) foram os vírus mais detectados por esta técnica no ano 2011, conforme Figura 2. Não foram observados casos de co-deteccção de vírus respiratórios por este método.

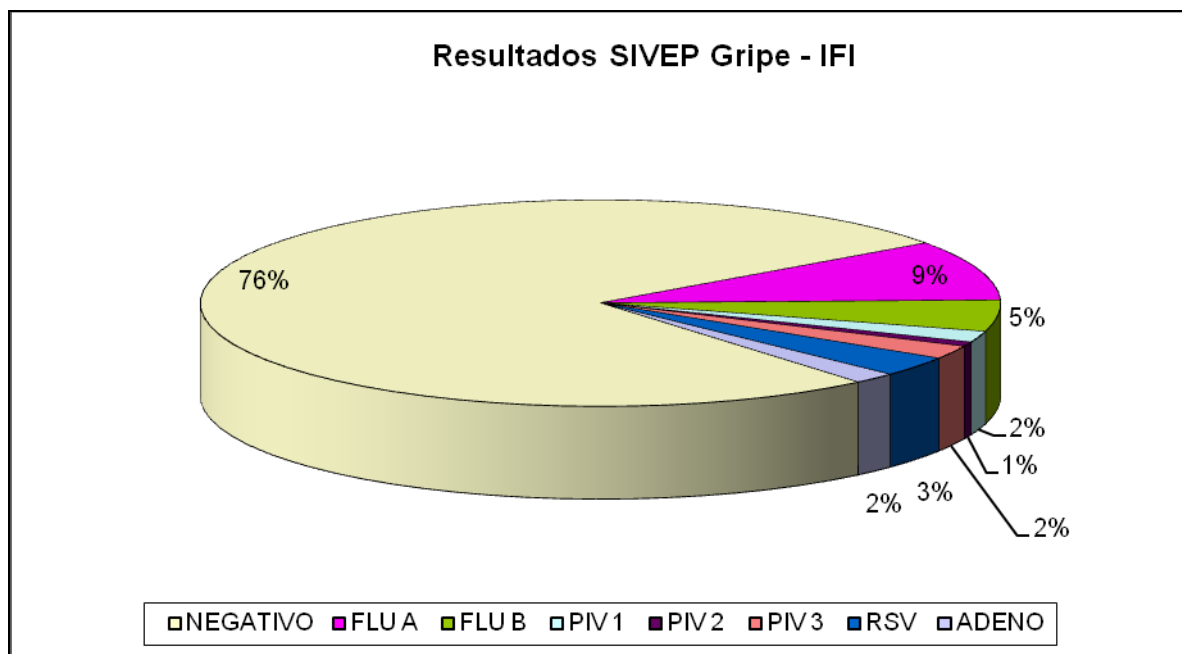


Figura 2: Resultados SIVEP-Gripe obtidos pela metodologia de IFI (*kit Respiratory Vírus Panel IFA - Biotrin*) no ano de 2011 em Curitiba (PR).

A metodologia de PCR detectou vírus respiratórios em 48% das amostras recebidas pelo SIVEP - Gripe, sendo que o hRV A/B (17%) foi o vírus mais detectado por esta técnica no ano 2011, seguidos do FLU A (10%) e FLU B (6%). Os vírus hMPV, hCoV tipos 229E/NL63 e OC43/HKU1 e hRV A/B, apenas pesquisados por este método, foram detectados em 26% das amostras recebidas, conforme Figura 3. Em 9 amostras foram observadas co-deteccção de 2 vírus respiratórios, sendo 2 casos de FLU B/PIV 1, 2 casos de FLU B/hRV, 1 caso de Adv/hRV, 1 caso RSV A/hRV, 1 caso RSV A/RSV B, 1 caso de hCoV/hRV e 1 caso PIV 1/hRV e em 1 amostra foi observado co-deteccção de 3 vírus respiratórios (FLU B/PIV 1/PIV 3). Nos casos de co-deteccção de FLU B/PIV 1 e FLU B/PIV 1/PIV 3, a metodologia de IFI apenas detectou o FLU B.

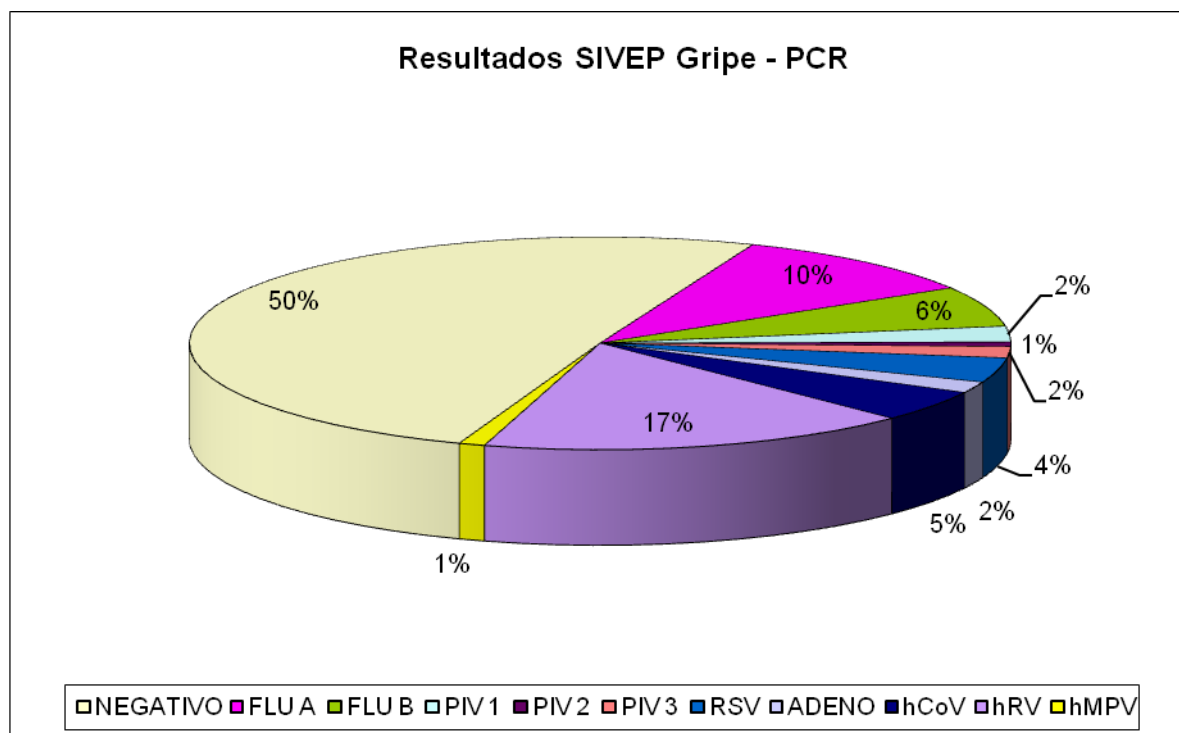


Figura 3: Resultados SIVEP-Gripe obtidos pela metodologia de PCR (*kit RV12 ACE Detection* -Seegene) no ano de 2011 em Curitiba (PR).

A comparação dos resultados de ambas as metodologias somente foi realizada em 220 (220/295 – 74,57%) amostras, onde foram detectados os vírus em comum das duas metodologias (AdV, FLU A, FLU B, PIV 1, PIV 2, PIV 3 e RSV) e os resultados negativos. Os resultados foram concordantes em 216 (216/220 – 98,18%) amostras e discordantes em 4 (4/220 - 1,81%) amostras, conforme Tabela 1. As amostras discordantes foram enviadas à FIOCRUZ (RJ), a qual confirmou a identidade do vírus detectado pela metodologia de PCR. Os vírus não detectados pela IFI foram 2 casos de FLU A, 1 caso de FLU B e 1 caso de RSV.

| | | PCR | |
|-----|----------|----------|----------|
| | | POSITIVO | NEGATIVO |
| IFI | POSITIVO | 68 | 0 |
| | NEGATIVO | 4 | 148 |

Tabela 1: Comparação dos resultados entre os vírus pesquisados em comum pelas metodologias de IFI (*kit Respiratory Virus Panel IFA* - Biotrin) e PCR (*kit RV12 ACE Detection* - Seegene) em amostras do SIVEP – Gripe no ano de 2011.

Considerando a metodologia de IFI como *Gold Standard* (Padrão Ouro), a metodologia de PCR com o *kit RV12 Ace Detection* teve 100% de sensibilidade e 97,4% de especificidade. No entanto, considerando a metodologia de PCR como *Gold Standard* (Padrão Ouro), a metodologia de IFI com o *kit Respiratory Virus Panel IFA* teve 94,4% de sensibilidade e 100% de especificidade.

A metodologia de IFI levou 4 horas para concluir o resultado da pesquisa de 7 vírus e o PCR levou 6 horas para determinar o resultado da pesquisa de 12 vírus respiratórios. Os laudos com os resultados da IFI foram liberados em uma mediana de 11 dias (variação 1 a 34 dias) e os do PCR em uma mediana de 10 dias (variação 1 a 25 dias), devido necessidades de repetições por inconclusões na interpretação dos resultados, ou falta de kit. A metodologia de IFI com o *kit Respiratory Virus Panel IFA* (Biotrin) custou aproximadamente R\$ 19,00 por amostra, enquanto que a metodologia de PCR com o *kit RV12 ACE Detection* (Seegene) custou aproximadamente R\$ 92,00 por amostra.

DISCUSSÃO

Considerando a importância de conhecer a morbimortalidade do vírus influenza, bem como contribuir com informações para produção de vacinas e antever uma pandemia por este vírus, o MS iniciou no ano de 2000, a implantação de um Sistema de Vigilância Epidemiológica da Influenza (SIVEP-Gripe) no âmbito nacional. Este sistema consiste da vigilância de síndrome gripal (SG) em unidades sentinelas e da vigilância universal e passiva de surto de SG. As unidades sentinelas deveriam informar semanalmente o total de atendimentos e número de atendimentos por SG, bem como coletar 5 amostras de ANF por semana e enviar aos Lacens com objetivo de realizar a IFI para a pesquisa dos vírus respiratórios. Os Lacens processam as amostras e informam semanalmente os resultados obtidos ao SIVEP-Gripe. ⁽¹⁶⁾

As amostras do SIVEP-Gripe começaram a ser coletadas e enviadas ao Lacen/PR no final do mês de abril de 2011, devido não ter ocorrido atendimentos de SG nas UBS do CIC e Cajuru nos meses anteriores. A partir do mês de abril de 2011 as temperaturas climáticas médias na região de Curitiba foram de 15°C, o que provavelmente contribuiu para a maior

transmissão de vírus respiratórios. ^(4, 17) Em relação a meta estabelecida pelo MS para coleta das amostras, que seria de 80% das semanas epidemiológicas do ano ⁽¹⁸⁾, o programa SIVEP-Gripe em Curitiba não conseguiu alcançar, devido a falta de atendimentos de SG nas primeiras 16 semanas do ano, contudo nas demais semanas a meta foi alcançada em 92% das semanas epidemiológicas, contribuindo para a determinação dos vírus respiratórios circulantes na região.

Pela metodologia de PCR com o *kit RV12 ACE Detection* (Seegene) conseguiu-se detectar vírus respiratórios em aproximadamente 50% dos casos de SG. No entanto com a metodologia de IFI com o *kit Respiratory Vírus Panel IFA* (Biotrin), preconizada pelo MS, a detecção de vírus respiratórios chegou a 24%. Essa diferença provavelmente ocorreu devido a metodologia de PCR pesquisar 12 vírus respiratórios e a metodologia de IFI pesquisar 7 vírus respiratórios. Dados semelhantes foram publicados por Freymuth *et al.* (2006)⁽²⁰⁾ e Kuypers *et al.* (2009)⁽¹⁹⁾.

Pela metodologia de IFI, os vírus mais incidentes foram o FLU A (9%) seguido do FLU B (5%). No entanto, pela metodologia de PCR o vírus mais incidente foi o hRV A/B (17%), seguidos do FLU A (10%) e FLU B (6%). A maior incidência do hRV A/B contribuiu para a maior positividade observada pela técnica de PCR, visto que o hMPV e o hCoV foram detectados em apenas 6% das amostras. Vários estudos demonstram que o vírus respiratório mais incidente em quadros de infecção respiratória é o hRV A/B ^(21, 22, 23, 24), principalmente em quadros de resfriado ⁽²⁵⁾, no entanto cabe-se ressaltar que este vírus foi encontrado em casos de SG (apresentando sintomas de febre acompanhado de pelo menos uma manifestação clínica respiratória e uma sistêmica). Lee *et al.* (2012) ⁽²⁶⁾ e Jin *et al.* (2009) ⁽²⁷⁾ reportaram que diferentes subtipos do hRV (A, B ou C) podem influenciar na gravidade do quadro clínico, juntamente com a suscetibilidade do indivíduo acometido, no entanto a metodologia do *kit RV12 Ace Detection* não subtipa este vírus em A ou B e não detecta o subtipo C, necessitando portanto ser realizado a subtipagem por outra metodologia molecular para investigar qual o subtipo que causou os quadros de SG ⁽²⁶⁾.

Não foi observado casos de co-infecção de vírus respiratórios nas amostras analisadas por IFI, no entanto o método de PCR detectou 10 casos de co-infecção. Em 60% dos casos de co-infecção foi detectado o hRV A/B e isto explica a maior detecção dos casos de co-infecção por esta metodologia, visto que IFI não pesquisa este vírus. O hRV A/B foi descrito em vários estudos como mais presente em casos de co-infecção^(23,28). Adicionalmente a

metodologia de PCR é mais sensível que a metodologia de IFI o que contribuiu para a detecção dos demais casos ^(22, 29, 30, 31).

A comparação dos resultados obtidos por ambas as metodologias, na pesquisa dos vírus em comum (AdV, FLU A, FLU B, PIV 1, PIV 2, PIV 3 e RSV), não mostrou diferença significativa, ao contrário do observado por outros estudos de comparação entre metodologias de IFI e PCR ^(19, 20, 32, 33), no entanto a coleta da amostra respiratória realizada nestes estudos foi de ANF e Swab de oro e nasofaringe. O resultado do presente estudo pode ser explicado pelo método de coleta usado para o programa SIVEP-Gripe (Aspirado de nasofaringe) ⁽¹⁶⁾. O ANF é realizado através de uma aspiração à vácuo das células da nasofaringe e assim é capaz de coletar de maneira mais eficiente a amostra do trato respiratório, preservando a integridade das células ciliadas e caliciformes (onde os vírus estão infectando), sendo assim o método de coleta de escolha para análise por IFI ^(34, 35, 36, 37), pois para realização desta metodologia há necessidade de células para visualização no microscópio de epifluorescência.

A metodologia de IFI com o *kit Respiratory Virus Panel IFA* foi mais rápida e aproximadamente 5 vezes mais barata do que a técnica de PCR com o *kit RV12 ACE Detection*. No entanto há o inconveniente da amostra precisar chegar ao laboratório dentro de 24 horas após a coleta para o seu imediato processamento de modo a preservar a morfologia celular. Adicionalmente, a interpretação do resultado de imunofluorescência é complexa, visto que necessita de um treinamento técnico específico para realização das leituras em microscópio de epifluorescência, além do problema dos interferentes da amostra (muco, hemácia) originando fluorescência inespecífica. Portanto, os resultados obtidos por esta metodologia devem ser interpretados com cautela, uma vez que este teste tem grandes chances de produzir um elevado número de resultados falso negativo ⁽³⁰⁾, fato este observado no presente estudo, que mostrou uma sensibilidade de 95% para esta técnica.

A metodologia de PCR pelo *kit RV12 ACE Detection* (Seegene) é realizada em várias etapas (extração, transcrição reversa, PCR e eletroforese), levando um tempo maior para sua execução. Adicionalmente o *kit* não apresenta controle de extração, por este motivo esta etapa da técnica precisa ser validada com a pesquisa do gene da *RNase P* do protocolo da pesquisa de influenza do CDC ⁽¹⁵⁾, encarecendo ainda mais o método de PCR. No entanto, esta metodologia apresentou a vantagem de ser mais sensível que a IFI e pesquisar outros 5 vírus respiratórios (hRV A/B, hCoV tipos 229E/NL63 e OC43/HKU1 e hMPV), principalmente o hRV, que foi o vírus mais incidente no programa SIVEP-Gripe no ano de 2011. Este método, ao contrário da metodologia de IFI, permite que a amostra possa ser congelada e depois

enviada para o Lacen, contribuindo com a possibilidade de implantação do programa SIVEP-Gripe nos demais municípios do estado do Paraná, acatando o preconizado pela Portaria nº 2693/2011⁽¹⁸⁾, que propõe como deve ser realizado o monitoramento de vírus respiratórios. Além disso, este método pode ser realizado em amostras coletadas por Swab, que é um método de coleta mais barato e menos desconfortável que o ANF^(31, 34).

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que os resultados obtidos na pesquisa dos vírus respiratórios por IFI e PCR foram concordantes em sua maioria, no entanto a metodologia de PCR foi mais sensível. Observou-se também que a metodologia de IFI foi mais rápida e barata, porém o PCR foi a metodologia de mais fácil interpretação, além de pesquisar mais 5 vírus respiratórios, contribuindo para um melhor monitoramento dos vírus respiratórios no Programa do SIVEP – Gripe.

Os dados do presente estudo sugerem que a implantação da metodologia de PCR para pesquisa de vírus respiratórios no programa SIVEP-Gripe seja vantajosa. No entanto, propõe-se que sejam realizados outros estudos comparativos entre metodologias de pesquisa destes vírus com a inclusão do método de PCR em tempo real, que apresenta a vantagem de ser mais sensível e mais rápido que o PCR convencional, além de ser realizado em menos etapas e permitir a automação da análise, agilizando a liberação de laudos.

REFERÊNCIAS

1. Coyle PV, Ong GM, O'Neill HJ, McCaughey C, De Ornellas D, Mitchell F, et al. A touchdown nucleic acid amplification protocol as an alternative to culture backup for immunofluorescence in the routine diagnosis of acute respiratory tract infections. *BMC Microbiol.* 2004; 4 - 41.
2. Shek LP, Lee B. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infection in the tropics. *Pediatr Respir Rev.* 2003; 4(2):105-11.

3. Daubin C, Parienti JJ, Vincent S, Vabret A, du Cheyron D, Ramakers M, Freymuth F, Charbonneau P. Epidemiology and clinical outcome of virus-positive respiratory samples in ventilated patients: a prospective cohort study. *Critical Care*. 2006;10:R142.
4. Tsuchiya LRRV, Costa LMD, Raboni SM, Nogueira MB, Pereira LA, Rotta I, et al. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. *J Infect*. 2005;51(5):401-7.
5. Lambert SB, Allen KM, Druce JD, Birch CJ, Mackay IM, Carlin JB, et al. Community epidemiology of human metapneumovirus, human coronavirus NL63, and other respiratory viruses in healthy preschool-aged children using parent-collected specimens. *Pediatrics*. 2007;120(4):e929-37.
6. Quan PL, Palacios G, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Pozo F, et al. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by greenchipresp oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2359-64.
7. Syrnis MW, Whiley DM, Thomas M, Mackay IM, Williamson J, Siebert DJ, et al. A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase – PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. *J Mol Diagn*. 2004;6(2):125-31.
8. de Arruda E, Hayden FG, McAuliffe JF, de Sousa MA, Mota SB, McAuliffe MI, et al. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. *J Infect Dis*. 1991;164(2):252-8.
9. Nascimento JP, Siqueira MM, Sutmoller F, Krawczuk MM, de Farias V, Ferreira V, et al. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro, occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991;33(4):287-96.
10. Miyao CR, Gilio AE, Vieira S, Hein N, Pahl MM, Betta SL, et al. Infecções virais em crianças internadas por doença aguda do trato respiratório inferior. *J Pediatr (Rio J)*. 1999;75(5):334-44.

11. Santos DE, Cardias CA, Mello WA. Inquérito soroepidemiológico para o vírus influenza em Belém, Pará, Brasil, 1992-1993. *Cad Saude Publica*. 1997;13(1):119-125.
12. BRASIL, Sistema de Informações em Saúde, 2011. Disponível em: www.datasus.gov.br. Acessado em: 15 mai 2012.
13. SESA, 2010. Secretaria de Estado de Saude. Superintendência de Vigilância em Saúde, Plano de Enfrentamento a Influenza Pandemico (H1N1) 2009 – Segunda Onda. Disponível em: [http://www.sesa.pr.gov.br/intranet/ftp_novo/CIEVS/Monitoramento de Doenças Respiratórias](http://www.sesa.pr.gov.br/intranet/ftp_novo/CIEVS/Monitoramento_de_Doenças_Respiratórias). Acessado em: 15 mai 2012.
14. Biotrin, Dublin, Ireland. *Kit Respiratory Virus Panel IFA*.
15. Centers For Disease Control And Prevention (CDC) 2009. Protocolo of real time RTPCR for swine Influenza A (H1N1). Disponível em: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimerTPCRprotocol_20090428.pdf. Acessado em: 15 mai 2012.
16. MINISTERIO DA SAUDE. Plano Brasileiro de Preparação para Enfrentamento de uma Pandemia de Influenza. IV versão. Brasília/DF. 2010.
17. Debur MC, Vidal LR, Stroparo E, Nogueira MB, Almeida SM, Takahashi GA, et al. Impact of human metapneumovirus infection on in and outpatients for the years 2006-2008 in Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010;105(8):1010–8.
18. MINISTERIO DA SAUDE. Portaria nº 2693 de 17 de Novembro de 2011. Diário Oficial da União. 37 – 38. Disponível em: <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>. Acessado em: 29 out 2012.

19. Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, et al. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol.*2006;78(11):1498-504.
20. Kuypers J, Campbell AP, Cent A, Corey L, Boeckh M. Comparison of conventional and molecular detection of respiratory viruses in hematopoietic cell transplant recipients. *Transp Infect Dis.* 2009;11(4):298-303.
21. Kim TH, Russell ML, Fonseca K, Aoki F, Horsman G, Van Caesele P, et al. Characteristics of respiratory viral infections during influenza season in Canadian Hutterite Communities. *Influenza Other Respi Viruses.* 2012;doi: 10.1111/irv.12021.
22. Beka H, Kilic A, Unuvar E, Onel M, Oguz F, Sidal M, et al. Frequency of Common Viruses in Etiology of Acute Respiratory Tract Infections. *Indian J Pediatr.* 2012.
23. Zhang G, Hu Y, Wang H, Zhang L, Bao Y, Zhou X. High Incidence of Multiple Viral Infections Identified in Upper Respiratory Tract Infected Children under Three Years of Age in Shanghai, China. *PLoS One.* 2012;7(9):e44568.
24. Longtin J, Marchand-Austin A, Winter AL, Patel S, Eshaghi A, Jamieson F, et al. Rhinovirus Outbreaks in Long-term Care Facilities, Ontario, Canada. *Emerg infect dis.* 2010;16(9):1463-5.
25. Wat D. The common cold: a review of the literature. *Eur J Intern Med.*2004;15(2):79-88.
26. Lee WM, Lemanske RF Jr, Evans MD, Vang F, Pappas T, Gangnon R, et al. Human Rhinovirus Species and Season of Infection Determine Illness Severity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012.

27. Jin Y, Yuan XH, Xie ZP, Gao HC, Song JR, Zhang RF, et al. Prevalence and clinical characterization of a newly identified human rhinovirus C species in children with acute respiratory tract infections. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2895–2900.
28. Jin Y, Zhang RF, Xie ZP, Yan KL, Gao HC, Song JR, et al. Newly identified respiratory viruses associated with acute lower respiratory tract infections in children in Lanzou, China, from 2006 to 2009. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 18:74–80.
29. Kim SR, Ki CS, Lee NY. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J Virol Methods.* 2009;156(1-2):111-6.
30. Nutter S, Cheung M, Adler-Shohet FC, Krusel K, Vogel K, Meyers H. Evaluation of indirect fluorescent antibody assays compared to rapid influenza diagnostic tests for the detection of pandemic influenza A (H1N1) pdm09. *PLoS One.* 2012;7(3):e33097.
31. Kanashiro TM, Vilas Boas LS, Thomaz AM, Tozetto-Mendoza TR, Setsuko M, Machado CM. Identification of respiratory virus in infants with congenital heart disease by comparison of different methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2011;53(5):241-6.
32. Gharabaghi F, Tellier R, Cheung R, Collins C, Broukhanski G, Drews SJ, et al. Comparison of a commercial qualitative real-time RT-PCR kit with direct immunofluorescence assay (DFA) and cell culture for detection of influenza A and B in children. *J Clin Virol.* 2008;42(2):190-3.
33. Gharabaghi F, Hawan A, Drews SJ, Richardson SE. Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clin Microbol Infect.* 2011;17(12):1900-6. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03529.x.
34. Kim C, Ahmed JA, Eidex RB, Nyoka R, Waiboci LW, Erdman D, et al. Comparison of Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swabs for the Diagnosis of Eight Respiratory Viruses by Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays. *PloS one.* 2011;6(6):e21610

35. Lambert SB, Whiley DM, O'Neill NT, Andrews EC, Canavan FM, Bletchly C, et al. Comparing nose-throat swabs and nasopharyngeal aspirates collected from children with symptoms for respiratory virus identification using real-time polymerase chain reaction. *Pediatrics*. 2008;122:e615–620.
36. Meerhoff TJ, Houben ML, Coenjaerts FE, Kimpfen JL, Hofland RW, Schellevis F, et al. Detection of multiple respiratory pathogens during primary respiratory infection: nasal swab versus nasopharyngeal aspirate using real-time polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:365–371.
37. Sung RY, Chan PK, Choi KC, Yeung AC, Li AM, Tang JW, et al. Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for diagnosis of acute viral respiratory infection. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3073–3076.