

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA MULTIDISCIPLINAR E EM ÁREA DA SAÚDE
FARMÁCIA – ANÁLISES CLÍNICAS – DIAGNÓSTICO ESPECIALIZADO

LUANA SOARES MARTÍNEZ

**Estudo de comparação entre técnicas moleculares de PCR e a técnica de
imunofluorescência direta na pesquisa de vírus respiratórios**

PORTO ALEGRE

2019

LUANA SOARES MARTÍNEZ

Estudo de comparação entre técnicas moleculares de PCR e a técnica de imunofluorescência direta na pesquisa de vírus respiratórios

Trabalho de Conclusão da Residência apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico especialista em Análises Clínicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora Farm.^a Dr^a Ana Paula Alegretti.

Co-orientador Farm^o Ms. Rodrigo Minuto Paiva

PORTO ALEGRE

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Martínez, Luana Soares

Estudo de comparação entre técnicas moleculares de PCR e a técnica de imunofluorescência direta na pesquisa de vírus respiratórios / Luana Soares Martínez. -- 2019.

42 f.

Orientadora: Ana Paula Alegretti.

Coorientadora: Rodrigo Minuto Paiva.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Residência em Área Profissional da saúde - Farmácia Análises Clínicas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Biologia molecular. 2. PCR em tempo real. 3. Técnica Direta de Fluorescência para Anticorpo. 4. Vírus. 5. Doenças Respiratórias. I. Alegretti, Ana Paula, orient. II. Paiva, Rodrigo Minuto, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LISTA DE ABREVIATURAS

AdV	Adenovírus humano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
FLU	Vírus Influenza
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IFD	Imunofluorescência direta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIV	Parainfluenza vírus humano
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa
RT-qPCR	Reação da transcriptase reversa em tempo real
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
VSR	Vírus sincicial respiratório

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. JUSTIFICATIVA	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1. VÍRUS RESPIRATÓRIOS	8
3.2. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	9
3.2.1. <i>Métodos não moleculares</i>	9
3.2.2. <i>Métodos moleculares</i>	10
4. OBJETIVOS.....	11
4.1. GERAL	11
4.2. ESPECÍFICOS.....	11
5. RESULTADOS	12
REFERÊNCIAS.....	26
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
ANEXO 1.....	36
ANEXO 2.....	37

1. Introdução

As infecções virais respiratórias são uma das principais causas de morbidade e mortalidade (TROEGER *et al.*, 2018). Diferentes vírus podem ser os responsáveis por infectar o sistema respiratório, com distintos níveis de gravidade podendo ir de um quadro clínico mais brando, até uma doença letal (SHI *et al.*, 2015).

Os principais vírus associados às infecções do trato respiratório são os vírus sincicial respiratório humano (VSR), vírus influenza (FLU), vírus parainfluenza humano (PIV), adenovírus humano (AdV), entre outros (ZHENG *et al.*, 2018). As infecções por FLU, VSR E PIV ocorrem epidemicamente. Já o AdV ocorre de maneira endêmica. A forma de transmissão se dá por contato direto e aerossóis, e muitos são os fatores que contribuem para a gravidade da doença, como características virais, quantidade do inoculo e fatores do próprio paciente, por exemplo: a idade, estado de saúde, condição imunológica, estado nutricional, além de fatores socioeconômicos (COUCEIRO; MENDES; SILVA, 2015).

As manifestações clínicas das infecções respiratórias se apresentam como gripe, resfriado, faringite, bronquite, bronquiolite e pneumonia. Os sintomas não são específicos para cada agente etiológico sendo assim indistinguíveis (SCHOT *et al.*, 2018).

O tratamento disponível para o FLU é com antivirais, sendo o oseltamivir a droga de escolha. Independentemente do estado vacinal e do tempo de início dos sintomas, o tratamento com oseltamivir deve ser oferecido para pessoas hospitalizadas e/ou com fatores de risco para complicações quando há suspeita ou confirmação da doença (COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES, 2016). Os demais vírus também podem ser tratados com antivirais como a ribavirina, e com broncodilatadores além de tratamentos de suporte (DRYSDALE; GREEN; SANDE, 2016).

Devido a transmissão viral ser de fácil propagação, é recomendado o isolamento dos pacientes, contribuindo no controle de infecções. Porém, em função da logística hospitalar muitas vezes há a necessidade de compartilhamento de quartos entre pacientes com diagnóstico clínico de infecção viral respiratória até que se tenha o diagnóstico virológico (SCOTTA *et al.*, 2016). Sabe-se que, mesmo com medidas de controle de infecção, o risco de transmissão do VSR pode chegar a 50%

(DRYSDALE; GREEN; SANDE, 2016). Considerando a importância clínica dos vírus respiratórios, a prevenção de infecção cruzada em pacientes hospitalizados determinaria menores taxas de morbidade, mortalidade e custo hospitalar (GOINS; TALBOT; TALBOT, 2011).

No HCPA, o diagnóstico de patógenos virais respiratórios é feito por meio da imunofluorescência direta (IFD), cuja sensibilidade é inferior em comparação à técnica molecular que se baseia na reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR pode aumentar a positividade das amostras consideravelmente quando comparada à IFD, aumentando significativamente a sensibilidade do exame diagnóstico (STEENSELS *et al.*, 2017). Em um estudo brasileiro, a positividade da PCR para adenovírus foi 9,6 vezes maior em relação à IFD (PUERARI *et al.*, 2015). Em relação ao VSR, a positividade foi 5 vezes maior em um estudo finlandês (JOKELA *et al.*, 2010).

Uma das variações da técnica de PCR que é muito aplicada na assistência a saúde, é a técnica de PCR em tempo real (qPCR), que pode ser combinada a técnica de transcriptase reversa (RT-qPCR) (BIONDO *et al.*, 2018; KAMEDA; CORRÊA; CASSIER, 2018). O uso de agentes intercalantes fluorescentes ou sondas de hidrólise como sistema de detecção, isso facilita a avaliação de presença ou ausência de agentes virais cujo material genômico é RNA (ácido ribonucleico). Hoje em dia existem kits comerciais para diagnóstico de vírus respiratórios do tipo *Point of Care* que facilitam o manejo de pacientes e também contribuem no gerenciamento de controle de infecções hospitalares (CHEN *et al.*, 2018).

Os testes rápidos para diagnóstico de patógenos respiratórios são cruciais para melhor manejo clínico dos casos (ZUMLA *et al.*, 2014). Em 2017, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou a comercialização do teste Xpert® Xpress FLU/RSV para diagnóstico de influenza A, influenza B e VSR. Segundo o fabricante, os resultados são liberados em até 30 minutos e a performance do teste é semelhante do Xpert® XC (CEPHEID, 2018), além de que é considerado *Point of Care* para detecção rápida. A sensibilidade e a especificidade do Xpert® XC para os vírus testados é de 98 e 100%, respectivamente, quando comparado à PCR convencional (SALEZ *et al.*, 2015).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi detectar a presença de vírus respiratórios em amostras de secreção de nasofaringe através de duas técnicas

moleculares de PCR disponíveis no mercado e, comparar os resultados com a técnica de imunofluorescência direta.

2. Justificativa

O diagnóstico rápido e preciso de determinados vírus respiratórios é de extrema importância, pois auxilia a equipe clínica na definição da intervenção a ser realizada, contribui no gerenciamento do controle de infecções hospitalares e condutas de combate à propagação viral e, também, se faz valer no uso racional de recursos diagnósticos. Este estudo possibilita a análise crítica de um teste com elevada sensibilidade, especificidade e, que garante redução do tempo de resposta do exame quando comparado a testes usuais, como IFD, cultura de células, sorologias.

3. Revisão da Literatura

3.1. Vírus respiratórios

As infecções virais respiratórias estão entre as doenças mais comuns que acometem adultos e crianças em todo o mundo, sendo relatada como uma das principais causas de morbidade e mortalidade (TROEGER *et al.*, 2018). Diferentes vírus podem ser os responsáveis por infectar o sistema respiratório, com variados níveis de gravidade podendo ir de um quadro clínico mais brando, até uma doença letal (SHI *et al.*, 2015).

Diferentes síndromes clínicas podem se manifestar de acordo com o vírus envolvido, condição imune do paciente, idade, entre outros (SCHOT *et al.*, 2018). As infecções respiratórias inferiores representam uma das 10 doenças com maior letalidade no mundo, sendo responsável por 4,0 milhões de mortes em 2016 (TROEGER *et al.*, 2018; WHO, 2019). O grupo mais suscetível a esse tipo de infecção é o infantil, sendo uma das principais causas de mortalidade antes dos 5 anos de idade (WHO, 2019).

Os principais vírus associados às infecções do trato respiratório que podem causar morbidades e até levar a morte são os vírus sincicial respiratório humano (VSR), vírus influenza (FLU), vírus parainfluenza humano (PIV), adenovírus humano (AdV), entre outros (COUCEIRO; MENDES; SILVA, 2015; ZHENG *et al.*, 2018). Os FLU são compostos por 6 gêneros, porém apenas 3 infectam os seres humanos, influenza A, B e C. As infecções por FLU, VSR E PIV ocorrem epidemicamente. Já o AdV ocorre de maneira endêmica (COUCEIRO; MENDES; SILVA, 2015).

A transmissão ocorre por contato direto e aerossóis, e muitos são os fatores que contribuem para a gravidade da doença, como características virais, quantidade do inóculo e fatores do próprio paciente, por exemplo: a idade, estado de saúde, condição imunológica, estado nutricional, além de fatores socioeconômicos (COUCEIRO; MENDES; SILVA, 2015). Sendo que o FLU é o responsável por um grande número de mortes em grupos de risco como os imunocomprometidos, gestante, crianças, entre outros (BIONDO *et al.*, 2018).

No Brasil durante o ano de 2017, segundo o último boletim epidemiológico, foram notificados 16.019 casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), sendo 12.388 (77,3%) com amostras processadas pelas unidades sentinela ligadas ao Ministério da Saúde. Destas, 16,1% (1.995/12.388) foram confirmadas como

SRAG por influenza e 23,0% (2.848/12.388) como outros vírus respiratórios (VSR, PIV, AdV). Foram notificados 2.056 óbitos por SRAG, o que corresponde a 12,8% (2.056/16.019) do total de casos (BRASIL, 2017).

3.2. Métodos diagnósticos

Os testes para diagnóstico de patógenos respiratórios são cruciais para melhor manejo clínico dos casos (ZUMLA *et al.*, 2014). Atualmente, as técnicas para diagnóstico de vírus respiratórios podem ser divididas em: moleculares e não moleculares (DAS; DUNBAR; TANG, 2018).

3.2.1. Métodos não moleculares

As técnicas não moleculares são: microscopia eletrônica, cultura de células, detecção de antígenos e ensaios sorológicos (DAS; DUNBAR; TANG, 2018).

A microscopia eletrônica é considerada uma das metodologias mais antigas para o exame direto no diagnóstico clínico de patógenos virais, mas é trabalhosa, demorada e tem um tempo de resposta maior do que outras técnicas, além disso exige elevada habilidade técnica e conhecimento para análises precisas (ROINGEARD, 2008). Desta forma, sua aplicabilidade é útil para pesquisa e a identificação inicial de agentes virais desconhecidos em surtos específicos (ROINGEARD, 2008).

O cultivo de células para detecção de vírus ainda tem sido considerado o “padrão ouro” para o diagnóstico de patógenos virais respiratórios por muitos anos (DAS; DUNBAR; TANG, 2018). Trata-se de um método bastante demorado, porém com avanços nos estudos foi possível diminuir significativamente o tempo de cultivo das células, chegando a um tempo de resposta de até 24 horas (DILNESSA; ZELEKE, 2017). Apesar dessa grande vantagem, vale ressaltar que muitos vírus clinicamente relevantes ainda assim são de difícil cultivo (HODINKA; KAISER, 2013).

Os ensaios por detecção de antígenos são a principal escolha nos laboratórios clínicos por serem relativamente baratos, fáceis de executar, apresentar sensibilidade melhor que o padrão ouro de cultivo e, o tempo de resposta ser inferior as demais técnicas (GINOCCHIO, 2007).

Os testes sorológicos se baseiam na identificação da presença de antígenos específicos para o agente viral, porém na maioria das infecções virais isso só será possível cerca de 2 semanas após a infecção inicial (DAS; DUNBAR; TANG,

2018). Essa técnica tem sido útil para pesquisas epidemiológicas, aumentando a probabilidade de identificação de infecções virais agudas (SAWATWONG *et al.*, 2012).

3.2.2. Métodos moleculares

Foi o químico americano Kary Mullis em 1983 que desenvolveu um processo que permitiria a multiplicação artificial do DNA (SAIKI *et al.*, 1985). Esse processo de multiplicação artificial ocorre por meio de ciclos repetidos de duplicação catalisada pela enzima DNA polimerase. Esta técnica se baseia na amplificação exponencial seletiva de uma quantidade reduzida de DNA de um conjunto de células, correspondendo a um mecanismo de síntese artificial de DNA num processo em cadeia que imita a replicação do DNA, que chamamos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Trata-se de um método rápido e eficiente para amplificação de sequências específicas a partir de uma mistura complexa de sequências genômicas ou DNA complementar. Pequenas quantidades de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes e em poucas horas, permitindo assim uma detecção rápida e confiável dos marcadores genéticos de doenças infecciosas (MACKAY *et al.*, 2007; PELT-VERKUIL; BELKUM; HAYS, 2008).

Atualmente, existem inúmeras variantes da técnica de PCR. A convencional se baseia na identificação de um produto amplificado ao final da reação, normalmente a visualização desse produto é feito através de eletroforese em gel de agarose (MACKAY *et al.*, 2007). A técnica de PCR convencional apresenta limitações, tais como, a grande facilidade de contaminação da amostra por outro DNA, incorporação errada de bases durante a replicação, a necessidade de excessiva quantidade do DNA alvo, pureza dos nucleotídeos e a concentração da solução de dNTP`s, uma vez que concentrações desiguais de dNTP`s podem provocar uma redução na fidelidade da DNA polimerase (MACKAY *et al.*, 2007).

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) é uma técnica utilizada na biologia molecular que permite tanto a detecção como a quantificação de amplificados de ácidos nucleicos (DNA e RNA) que tem sido utilizado nos laboratórios de pesquisa e de diagnósticos clínicos, principalmente, pela capacidade de gerar resultados com maior sensibilidade, reprodutibilidade, precisão, velocidade na análise, facilidade na quantificação, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação (CARVALHO; DE - RICCI; AFFONSO, 2015).

4. Objetivos

4.1. Geral

Detectar a presença de vírus respiratórios em amostras de secreção de nasofaringe através de duas técnicas moleculares de PCR disponíveis no mercado e, comparar os resultados com a técnica de imunofluorescência direta.

4.2. Específicos

Analisar as amostras e verificar a concordância dos resultados da técnica de IFD com a técnica molecular RT-PCR em tempo real Xpert® Xpress Flu/RSV.

Analisar as amostras e verificar a concordância dos resultados da técnica de IFD com a técnica molecular RT-PCR em tempo real XGen Multi PR21.

Verificar a concordância entre ambas as técnicas moleculares testadas neste trabalho.

5. Resultados

Estudo de comparação entre técnicas moleculares de PCR e a técnica de imunofluorescência direta na pesquisa de vírus respiratórios

Farm^a Luana S. Martínez

Farm^o Ms. Rodrigo M. Paiva

Farm^a Dr^a. Ana Paula Alegretti*

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Diagnóstico Laboratorial.

*correspondência: aalegretti@hcpa.edu.br

Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa Cecília. Porto Alegre – RS.

RESUMO

Introdução

Uma das principais causas de internações hospitalares em crianças é por infecção respiratória aguda, sendo o diagnóstico laboratorial rápido e preciso de suma importância para o atendimento destes pacientes. Diante disso, este trabalho verificou a concordância do teste de imunofluorescência direta (IFD) em relação a duas técnicas moleculares disponíveis no mercado.

Metodologia

Foram analisadas 38 amostras de secreção de nasofaringe oriundas da rotina de um hospital universitário de alta complexidade, onde inicialmente foram testadas para a presença ou ausência de vírus respiratórios pela técnica de IFD utilizando o kit D³ Ultra™ DFA. Após essas amostras foram testadas pelas técnicas moleculares de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real Xpert® Xpress Flu/RSV (*Point of Care*) e outro teste, um multiplex com capacidade para detecção de 21 patógenos respiratórios, o RT-PCR em tempo real XGen Multi PR21.

Resultados e discussão

O índice de concordância *Kappa* entre as técnicas IFD e Xpert® Xpress Flu/RSV foi de 0,629 ($p=$) que evidencia uma concordância forte. Entre as técnicas moleculares Xpert® Xpress Flu/RSV e XGen Multi PR21 foi de 0,768 ($p<0,1$), evidenciando uma forte concordância entre os resultados obtidos. Já entre as técnicas de IFD e XGen Multi PR21, o índice *Kappa* foi de 0,535 ($p<0,1$), que mostra moderada concordância entre os resultados. Apesar de a análise estatística apresentar uma concordância aceitável, foram identificadas 13 amostras com resultados negativos para a IFD, sendo que, 92% destes resultados foram positivos pelo teste molecular XGen Multi PR21.

Conclusão

Através do estudo de comparação entre as técnicas moleculares e a IFD, 13 amostras com resultados negativos pela IFD, foi possível detectar patógenos virais pelo método XGen Multi PR21, o que caracteriza um aumento de sensibilidade do ensaio molecular, apesar da análise estatística apresentar uma concordância aceitável. No entanto, estudos adicionais de custos são necessários.

Palavra-chave: Diagnóstico molecular, PCR em tempo real, imunofluorescência direta, vírus respiratórios, infecção respiratória.

1. INTRODUÇÃO

As infecções virais respiratórias são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em crianças menores de 5 anos de idade (TROEGER *et al.*, 2018; WHO, 2019). Diversos vírus podem ser os responsáveis por infectar o sistema respiratório, com distintos níveis de gravidade podendo ir de um quadro clínico mais brando, até uma doença letal (SHI *et al.*, 2015). Diferentes síndromes clínicas podem se manifestar de acordo com o vírus envolvido, condição imune do paciente, idade, entre outros (SCHOT *et al.*, 2018). As manifestações clínicas mais evidentes das infecções respiratórias se apresentam como gripe, resfriado, faringite, bronquite, bronquiolite e pneumonia, porém, os sintomas não são específicos para cada agente etiológico (SCHOT *et al.*, 2018).

No mundo, as infecções do trato respiratório inferior representam uma das 10 doenças com maior letalidade, tendo sido responsável por 4 milhões de mortes em 2016 (TROEGER *et al.*, 2018; WHO, 2019). Na população infantil com menos de 5 anos foram mais de 600.000 mortes (TROEGER *et al.*, 2018). No Brasil, durante o ano de 2017, segundo o último boletim epidemiológico, foram notificados 16.019 casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), sendo 12.388 (77,3%) com amostras processadas pelas unidades sentinela ligadas ao Ministério da Saúde. Destas, 16,1% (1.995/12.388) foram confirmadas como SRAG por influenza e 23,0% (2.848/12.388) como outros vírus respiratórios (vírus sincicial respiratório, parainfluenza, adenovírus). Foram notificados 2.056 óbitos por SRAG, o que corresponde a 12,8% (2.056/16.019) do total de casos (BRASIL, 2017).

Atualmente, as técnicas para diagnóstico de vírus respiratórios podem ser divididas em: moleculares e não moleculares (DAS; DUNBAR; TANG, 2018). As técnicas não moleculares são: microscopia eletrônica, cultura de células, detecção de antígenos e ensaios sorológicos (DAS; DUNBAR; TANG, 2018). Já as técnicas moleculares são ensaios que se baseiam na amplificação de ácidos nucleicos para a detecção e identificação de patógenos virais, podendo identificar um patógeno por reação ou até mesmo múltiplos alvos (reação multiplex), devido à capacidade de detectar mais de uma sequência alvo por reação (DAS; DUNBAR; TANG, 2018).

As técnicas diagnósticas mais precisas são recomendadas por apresentarem diversos benefícios à saúde dos pacientes como, por exemplo, receber o tratamento antiviral apropriado (ex.: uso de oseltamivir na infecção pelo

vírus influenza), contribuir no gerenciamento do controle de infecção através de medidas apropriadas (ex.: contenção de gotículas respiratórias para minimizar o risco de disseminação nosocomial); poder interromper a busca por um diagnóstico, mesmo se não houver agente antiviral benéfico para o vírus respiratório encontrado; e, fornecer informações mais precisas às autoridades de saúde pública sobre quais vírus estão circulando na comunidade para que eles possam ajustar as políticas de saúde pública de acordo as necessidades locais (BRADLEY *et al.*, 2011; MAHONY, 2008).

A técnica considerada “padrão ouro” para diagnóstico diferencial viral é a cultura celular (HEMATIAN *et al.*, 2016), porém muitas outras técnicas têm sido utilizadas para este fim, devido a elevada sensibilidade, especificidade e, principalmente, redução do tempo de resposta do exame (DAS; DUNBAR; TANG, 2018). Em vista disso, o cenário está em constante mudança e já há autores que descrevem as técnicas moleculares como novo “padrão ouro” no diagnóstico dos vírus respiratórios (DAS; DUNBAR; TANG, 2018).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi detectar a presença de vírus respiratórios em amostras de secreção de nasofaringe através de duas técnicas moleculares de PCR disponíveis no mercado e, comparar os resultados com a técnica de imunofluorescência direta.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) unindo técnicas laboratoriais aplicadas na rotina assistencial das Unidades de Diagnóstico Especializado e Bioquímica Clínica e aprovado pelo Comitê de Ética local sob o número 15338919.5.0000.5327.

2.1. Amostras Clínicas

Foram utilizadas 38 amostras de secreção de nasofaringe selecionadas por conveniência a partir de pacientes atendidos no HCPA com suspeita clínica de infecção respiratória. Os espécimes clínicos foram encaminhados para Unidade de Bioquímica Clínica para realização do exame assistencial de pesquisa de vírus respiratórios através da técnica de IFD, conforme fluxo da rotina assistencial. Após a realização do exame laboratorial, o volume restante das amostras clínicas foi armazenado em um banco de amostras biológicas que tem por objetivo a realização

de pesquisa científica, validação e verificação de técnicas laboratoriais, de acordo com as especificações do controle de qualidade local. Este estudo utilizou as amostras clínicas provenientes deste banco de amostras, sendo que o período de coleta dos respectivos espécimes clínicos foi de agosto a dezembro de 2018, caracterizando um estudo transversal. Essas amostras foram aliqüotadas em tubos de 1,5mL, devidamente identificados com etiqueta térmica e armazenados em freezer -80°C até a realização dos ensaios moleculares propostos (BURD, 2010).

2.2. Teste diagnóstico por Imunofluorescência direta D³ Ultra™ (IFD)

O exame assistencial para pesquisa de vírus respiratórios foi realizado pela técnica de imunofluorescência direta utilizando o kit D³ Ultra™ DFA (Quidel - Diagnostic Hybrids Inc., 2015). A técnica se baseia na ligação de anticorpos monoclonais específicos para antígenos virais que por sua vez estão marcados diretamente com fluoresceína e são identificados por microscopia de fluorescência. As amostras de secreção de nasofaringe foram centrifugadas obtendo-se um botão de células epiteliais, retirado o sobrenadante e ressuspendidas em PBS repetidas vezes, até que se tenha retirado todo o muco natural da amostra. Após, 25µL da suspensão celular foram fixadas em lâmina com acetona e, realizada a marcação com os reagentes conforme orientações do fabricante do kit. Inicialmente as amostras são testadas com um reagente de triagem que contém anticorpos para os sete patógenos detectáveis por esse kit, são eles: vírus influenza A e B, vírus sincicial respiratório (VSR), adenovírus (AdV), vírus parainfluenza (PIV) 1, 2 e 3. Quando positivo, a amostra foi testada com anticorpo monoclonal separadamente para todos os vírus. Para cada kit utilizado foram testadas amostras controles positivo e negativo. A interpretação dos resultados foi visual por microscopia de fluorescência. Os padrões de fluorescência das células infectadas podem variar conforme o patógeno, mas em suma, a fluorescência positiva é verde maçã brilhante, enquanto que na ausência de positividade a fluorescência é vermelha. Este estudo não realizou propriamente a técnica de IFD nas amostras clínicas avaliadas, mas utilizou os resultados dos exames assistenciais através da consulta em prontuário eletrônico de cada amostra de paciente incluída na pesquisa.

2.3. RT-PCR em tempo real Xpert® Xpress Flu/RSV

O sistema molecular *Point of Care* (POC) Gene Xpert[®] integra todos os processos desde a extração de amostras, purificação, amplificação e detecção das sequências-alvo de ácidos nucleicos em amostras clínicas, utilizando transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real.

Neste estudo utilizamos o kit Xpert[®] Xpress Flu/RSV no sistema Gene Xpert[®] para análise das amostras conforme instruções do fabricante (CEPHEID, 2018), este kit é capaz de detectar apenas os vírus influenza A e B, e o vírus sincicial respiratório. Em um volume de 300µL de amostra foi adicionado proteinase K (fornecido pelo kit) em mesmo volume, que estimula a quebra de ligações peptídicas favorecendo a extração dos ácidos nucleicos. Após esse tratamento inicial o material foi transferido para o cartucho de uso único, no qual ocorrem os processos desde a extração de DNA e RNA, amplificação e detecção das sequências-alvo de ácidos nucleicos. Os controles de qualidade de extração e de amplificação são processados no mesmo cartucho em que ocorre toda a reação, desta forma o controle de qualidade é realizado individualmente por amostra. O software do sistema Gene Xpert[®] interpreta os controles de qualidade, assim como o resultado do ensaio e informa o patógeno identificado de forma qualitativa.

2.4. RT-PCR em tempo real XGen Multi PR21

Para extração dos ácidos nucleicos das amostras de secreção de nasofaringe foi utilizado o sistema automatizado por *beads* magnéticas com o kit Viral Total Nucleic Acid Purification Maxwell[®] (Promega Biotecnologia do Brasil, Ltda.), conforme recomendações do fabricante. Após a extração dos ácidos nucleicos, estes foram quantificados por espectrometria utilizando NanoDrop[™] Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) e analisadas quanto a sua integridade e presença de contaminantes com base na razão da absorbância A_{260}/A_{280} . Para realização do ensaio foram utilizadas amostras com concentração $\leq 10\text{ng}/\mu\text{L}$ e então armazenadas em freezer -80°C até a realização dos ensaios (BURD, 2010).

O teste molecular *in vitro* XGen Multi PR21 (Mobius Life Science Ltda., 2018) é capaz de detectar qualitativamente ácidos nucleicos de até 21 patógenos diferentes responsáveis por infecções respiratórias em amostras clínicas. Os patógenos são: Adenovírus humano, Bocavírus humano, Coronavírus humano 229E, Coronavírus humano HKU1, Coronavírus humano NL63, Coronavírus humano

OC43, Enterovírus, H1N1, Influenza A, Influenza B, Metapneumovírus humano A, Metapneumovírus humano B, *Mycoplasma pneumoniae*, Parainfluenza humano 1, Parainfluenza humano 2, Parainfluenza humano 3, Parainfluenza humano 4, Parechovírus humano, Rinovírus humano, Vírus sincicial respiratório A, Vírus sincicial respiratório B. O princípio da técnica se baseia na amplificação do RNA viral transcrito em cDNA utilizando *primer* específico para cada alvo no processo RT, seguido pela PCR. A reação acontece em um único tubo para identificação de até 4 diferentes patógenos, sendo assim, uma reação multiplex. Foi utilizado o aparelho de PCR em Tempo Real ABI 7500 (System[®] Applied Biosystems[™]) para detecção. O kit utiliza o vírus da Arterite Equina (EAV) como controle de extração, que foi adicionado em cada amostra no processo de extração, além dos controles positivo e negativo para cada alvo pesquisado e, que foram testados em cada ensaio realizado. A interpretação dos resultados foi realizada através do Software ABI 7500 (Software Sequence Detection System[®] Applied Biosystems[™]), conforme parâmetros de análise recomendados pelo fabricante do kit.

As características gerais dos testes de diagnóstico para pesquisa de vírus respiratórios por IFD e pelas técnicas moleculares estão devidamente descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Características gerais dos testes de diagnóstico para pesquisa de vírus respiratórios por IFD e moleculares propostos:

	D³ Ultra™	Xpert® Xpress Flu/RSV	XGen Multi PR21
Princípio da técnica	Detecção de antígeno por imunofluorescência direta	Amplificação de ácidos nucleicos em tempo real	Amplificação de ácidos nucleicos em tempo real
Sensibilidade	88-94% ⁶	99-100% ⁶	95-100% ⁶
Especificidade	96-99% ⁶	98-100% ⁶	85-100% ⁶
Tempo de execução	3 horas	1 hora	4 horas
Tempo de atividade manual	3 horas	5 min	1,5 hora
Tipos de espécime	Preferencialmente secreção de nasofaringe	Swab nasal ou secreção de nasofaringe	Swab nasal ou secreção de nasofaringe
Estabilidade da amostra	Refrigerado por poucas horas	Até 24 horas em temperatura ambiente	Até 24 horas em temperatura ambiente
Patógenos detectáveis	Vírus influenza A e B, vírus sincicial respiratório, adenovírus, vírus parainfluenza 1, 2 e 3	Vírus influenza A e B, vírus sincicial respiratório	Adenovírus, Bocavírus, Coronavírus 229E, Coronavírus HKU1, Coronavírus NL63, Coronavírus OC43, Enterovírus, H1N1, Influenza A e B, Metapneumovírus A e B, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , Parainfluenza 1, 2, 3 e 4, Parechovírus, Rinovírus, Vírus sincicial respiratório A e B
Equipe apta para execução	Técnico e especialista	Técnico	Técnico e especialista
Nº de exames por kit	220*	10	62
Frequência de controle de qualidade (1 positivo e 1 negativo)	5 por kit	1 por paciente	1 por análise
Custo aproximado do kit	6.500,00	2.000,00	20.000,00

*Valor estimado de acordo com o consumo anual local. Essa quantidade pode variar em função dos resultados positivos e/ou negativos.

2.5 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil para variáveis contínuas e como percentual de concordância para as variáveis categóricas. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste de qui-quadrado e índice de concordância Kappa (LANDIS; KOCH, 1977). O intervalo de confiança estabelecido foi de 90% ($p < 0,1$). As análises foram realizadas utilizando-se o programa SPSS 22.0 para Windows® (StataCorp, College Station, TX, USA).

3 RESULTADOS

A idade mediana dos 38 pacientes analisados foi de menos de 1 ano (0 à 1 anos), o tempo médio de internação foi de 8 dias e meio (6 à 37,5 dias).

As 38 amostras de secreção de nasofaringe foram testadas pelas três técnicas aqui analisadas. O ensaio de referência IFD, apresentou 5 amostras positivas para Influenza A, 5 amostras positivas para Influenza B, 15 amostras positivas para VSR, e 13 amostras negativas, conforme descrito na Tabela 2. Os resultados foram semelhantes pela técnica Xpert® Xpress Flu/RSV. A técnica molecular pelo kit XGen Multi PR21 apresentou amostras positivas significativamente maior. Só uma amostra foi negativa, ou seja, 37 positivas, sendo a maior parte destas para VRS. Houve um expressivo número de amostras com múltiplos patógenos virais detectáveis (28) em função de a técnica ser multiplex.

Tabela 2. Caracterização dos vírus respiratórios detectados pelas técnicas de imunofluorescência direta e duas técnicas moleculares.

	IFD D ³ Ultra™	Xpert® Xpress Flu/RSV	XGen Multi PR21
Influenza A	5	3	7
Influenza B	5	2	2
VSR	15	16	23
Múltiplos vírus	-	5	28
Negativos	13	12	1

As informações de desempenho diagnóstico dos dois ensaios moleculares em relação ao ensaio de IFD estão representadas na Figura 1.

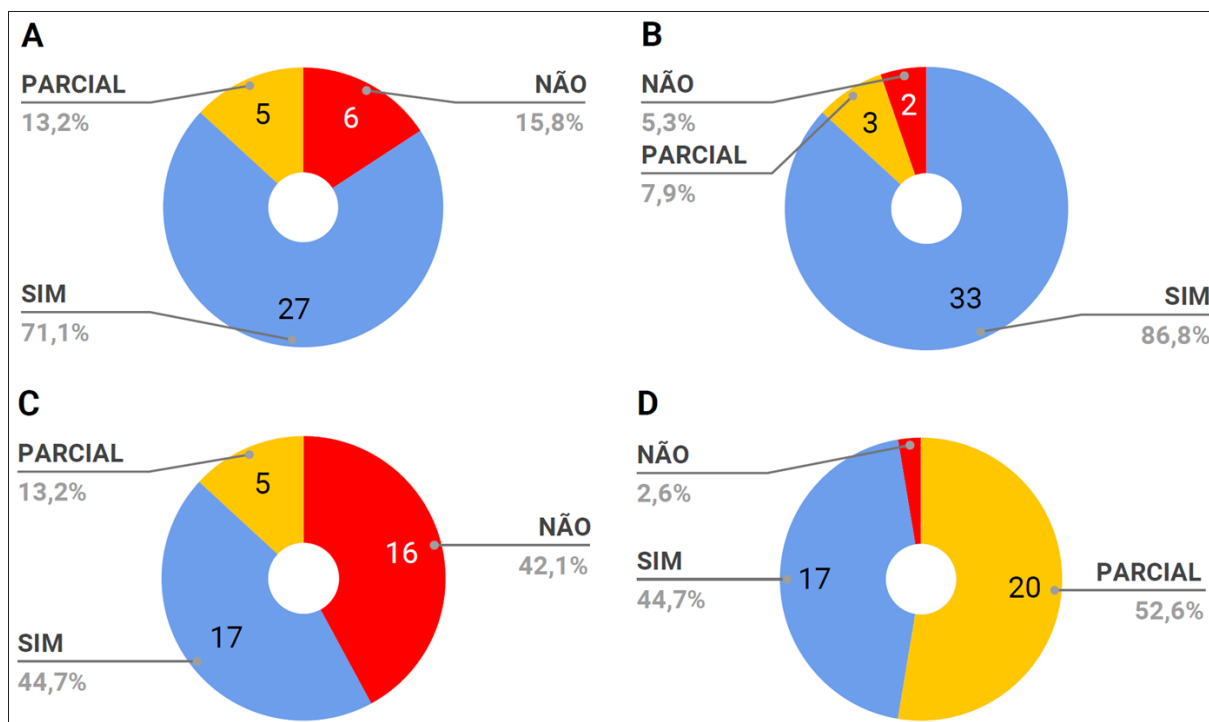


Figura 1. Característica de desempenho dos ensaios moleculares em relação ao teste de imunofluorescência direta (IFD). (A) Representa o percentual de concordância entre os testes de IFD D³ Ultra™ e o molecular Xpert® Xpress Flu/RSV. (B) Representa o percentual de concordância entre os testes moleculares Xpert® Xpress Flu/RSV e XGen Multi PR21. (C) Representa o percentual de concordância entre os testes de IFD D³ Ultra™ e o molecular XGen Multi PR21. (D) Representa o percentual de concordância entre os três testes avaliados no estudo, IFD e os moleculares.

Considerando que o ensaio molecular POC Xpert® Xpress Flu/RSV realiza a pesquisa dos vírus Influenza A, B e VSR, foram selecionadas as amostras por conveniência a partir dos resultados de IFD que tenham sido positivas para esses mesmos vírus e também amostras negativas. Observou-se que 42,1% (n=16) foram positivas para VSR, 31,6% (n=12) foram negativas para os vírus detectáveis neste ensaio, 7,9% (n=3) foram positivas para vírus Influenza A, 5,3% (n=2) foram positivas para vírus Influenza B e 13,6% (n=5) foram positivas para mais de um vírus, caracterizando coinfeção viral não vista no teste de IFD.

A análise de concordância entre essas duas técnicas mostrou que 71,1% (n=27) dos resultados foram compatíveis, 15,8% (n=6) dos resultados não foram compatíveis e, 13,2% (n=5) apresentaram resultado positivo para mais de um patógeno, considerando-se uma concordância parcial, já que pelo ensaio de IFD não foi evidenciado coinfeção por mais de um vírus pesquisado. O índice de concordância Kappa entre as técnicas IFD e Xpert® Xpress Flu/RSV foi de $0,629 \pm 0,091$ ($p=0,092$) que evidencia uma concordância forte (LANDIS; KOCH, 1977).

As mesmas amostras testadas pela técnica molecular POC utilizando o kit Xpert[®] Xpress Flu/RSV foram testadas por outra técnica molecular de RT-PCR em tempo real, kit XGen Multi PR21, que por sua vez é capaz de detectar 21 patógenos relacionados a infecções respiratórias, em sua maioria virais. Observou-se que 28,9% (n=11) das amostras foram positivas para apenas um patógeno (H1N1=1; Coronavírus humano HKU1=1; Parainfluenza tipo 3=1; VSR=8) e 68,5% (n=26) das amostras apresentaram pelo menos 2 patógenos, caracterizando coinfeção. Apenas uma amostra (2,6%) foi negativa para todos os patógenos testados.

Das 38 amostras analisadas pelo kit XGen Multi PR21, 86,8% (n=33) apresentaram resultados concordantes em relação ao ensaio Xpert[®] Xpress Flu/RSV, e apenas 44,7% (n=17) se mostraram concordantes com a técnica de IFD. Apenas 5,3% (n=2) dos resultados não concordam entre as técnicas moleculares, já em relação à técnica de IFD 42,1% (n=16) das análises não foram concordantes. Em relação aos resultados parciais, isto é, em que mais de um patógeno foi detectado na amostra, mas apenas um foi concordante, assim, obtivemos 7,9% (n=3) para a técnica molecular Xpert[®] Xpress Flu/RSV e 13,2% (n=5) para a técnica de IFD. Os índices de concordância Kappa entre as técnicas moleculares Xpert[®] Xpress Flu/RSV e XGen Multi PR21 foi de $0,768 \pm 0,081$ ($p=0,013$), evidenciando uma forte concordância entre os resultados obtidos. Já entre as técnicas de IFD e XGen Multi PR21, o índice Kappa foi de $0,535 \pm 0,101$ ($p=0,079$), que mostra moderada concordância entre os resultados (LANDIS; KOCH, 1977).

A avaliação de concordância entre as três técnicas fica dificultada em função das suas diferentes características técnicas e diagnósticas, porém de forma geral demonstrou-se que 44,7% (n=17) das amostras foram concordantes entre os resultados, apenas 2,6% (n=1) não foi concordante em nenhum resultado, e mais da metade, 53,6% (n=20) obteve resultado parcialmente concordante.

4 DISCUSSÃO

Durante o período de coleta das amostras foram executados 310 exames de pesquisa de vírus respiratórios por imunofluorescência direta (IFD). Destes 310 exames, 66,8% (n=207) obtiveram resultados negativos, 15,8% (n=49) foram positivos para vírus Parainfluenza tipo 3, 11,9% (n=37) foram positivos para vírus Sincicial Respiratório (VSR), 1,6% (n=5) foram positivos para vírus Influenza A, 1,6% (n=5) foram positivos para vírus Influenza B, 1,3% (n=4) foram positivos para

Adenovírus, 0,3% (n=1) foi positivo para vírus Parainfluenza tipo 1, 0,3% (n=1) foi positivo para vírus Parainfluenza tipo 2 e, 0,3% (n=1) foi inconclusivo sendo necessária repetição.

Estudos têm demonstrado a incidência das infecções respiratórias virais em crianças menores de 5 anos, em que os vírus mais comuns são vírus da influenza, o vírus sincicial respiratório, o parainfluenza e o metapneumovírus (LI *et al.*, 2019; MARCONE *et al.*, 2015). Nossos resultados mostram que os patógenos principais foram os vírus parainfluenza tipo 3, vírus sincicial respiratório, seguido pelos vírus influenza A e B. Considerando a sazonalidade dos vírus, isso se reflete nos nossos resultados. Os vírus influenza e VSR são mais presentes durante o inverno, porém o tempo de duração da epidemia é maior para VSR, podendo estar ainda presente no início da primavera (LI *et al.*, 2019). Já os vírus parainfluenza são endêmicos na primavera e início do verão (LI *et al.*, 2019), justamente o período de coleta das amostras aqui analisadas.

Apesar da concordância moderada ($\kappa=0,629\pm 0,091$) entre o teste molecular com o kit Xpert[®] Xpress Flu/RSV e a técnica de IFD, a diferença encontrada entre ambas se deve principalmente à divergência de sensibilidade entre os métodos. Já foi demonstrado que a técnica de IFD possui boa sensibilidade e especificidade, porém quando comparado com técnicas moleculares, estas superam IFD (MARIMÓN; NAVARRO-MARÍ, 2017). Podem ocorrer resultados falsos negativos em função da subjetividade da análise que se dá por microscopia, necessitando assim equipe altamente experiente para realização das análises (MAHONY, 2008).

Podemos observar que as análises realizadas por métodos moleculares detectaram mais de um tipo viral em determinadas amostras, sendo que o ensaio multiplex que possui uma abrangência maior de vírus foi mais significativo (n=26), enquanto que para IFD não foi relatado mais de um vírus por amostra. Isso pode ser atribuído à quantidade de cópias virais presente na amostra, sendo que técnicas moleculares tem uma capacidade de identificar múltiplas infecções virais em uma frequência até 10 vezes maior que a IFD (KUYPERS *et al.*, 2006). Por este motivo também se justifica a concordância fraca ($\kappa=0,535\pm 0,101$) entre a técnica de IFD e o método multiplex XGen Multi PR21. Além de maior sensibilidade e especificidade, a técnica molecular detectou múltiplos patógenos em 5 amostras que a IFD não foi capaz de detectar, isso considerando apenas patógenos comuns entre os ensaios.

Sabe-se que técnicas moleculares estão substituindo as antigas técnicas como IFD, sorologias e cultura de células para o diagnóstico viral, inclusive sendo consideradas como o novo “padrão ouro” em função da alta sensibilidade e especificidade aliada a novos formatos cada vez mais simples de processamento (DAS; DUNBAR; TANG, 2018).

Por ainda estar em grande expansão, essa tecnologia possui um valor agregado muitas vezes elevado, o que faz com que se tenha uma análise crítica do custo benefício (DAS; DUNBAR; TANG, 2018). De qualquer forma, sua alta sensibilidade e especificidade aliada a novos formatos cada vez mais simples de processamento tem tornado o uso da técnica molecular mais frequente, principalmente quando se trata de períodos endêmicos (DAS; DUNBAR; TANG, 2018).

Em geral, testes de diagnóstico rápido são úteis nas infecções respiratórias, permitindo uma melhor abordagem de cuidados ao paciente (MARIMÓN; NAVARRO-MARÍ, 2017). Os testes de detecção de antígenos podem ser considerados POC, porém, a maioria das técnicas moleculares não. Por sua vez, essas apresentam melhor especificidade, e principalmente sensibilidade (MAHONY, 2008; MARIMÓN; NAVARRO-MARÍ, 2017). Com o avanço das tecnologias e a necessidade crescente de técnicas mais sensíveis e precisas, de fácil manipulação e interpretação, têm surgido equipamentos capazes de realizar técnicas moleculares com base na amplificação de ácidos nucleicos POC. Inclusive, o teste Xpert® Xpress Flu/RSV é recomendado para uso sazonal durante epidemias (DAS; DUNBAR; TANG, 2018).

Alguns autores descrevem que, somente exame físico ou exames laboratoriais adicionais não são suficientes para diagnosticar pneumonia em crianças e, que testes combinados são necessários para aumentar a certeza diagnóstica (SCHOT *et al.*, 2018). Segundo *Guideline* americano (BRADLEY *et al.*, 2011), recomendado pelas instituições Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA - *Infectious Diseases Society of America*) e Sociedade de Doenças infecciosas Pediátricas (PIDS - *Pediatric Infectious Diseases Society*), testes sensíveis e específicos para o diagnóstico rápido do vírus influenza e outros vírus respiratórios devem ser usados na avaliação de crianças com suspeita de pneumonia adquirida na comunidade. Um resultado positivo para Influenza pode contribuir no uso racional de exames de apoio diagnóstico, antibioticoterapia e

terapia antirretroviral (BRADLEY *et al.*, 2011). Assim como a ausência de positividade, que sinaliza para outras possibilidades de intervenção clínica (BRADLEY *et al.*, 2011).

Outro estudo afirma que, técnicas moleculares são capazes de gerar um alto rendimento de diagnósticos virais e bacterianos, mas que seu impacto nas práticas clínicas ainda é questionável devido à baixa contribuição na tomada de decisão (WISHAUPT; VERSTEEGH; HARTWIG, 2015).

Apesar de já terem evidenciado que a duração da antibioticoterapia e a mortalidade não foram afetadas pelo diagnóstico precoce da influenza, dados demonstram uma redução no tempo de hospitalização em pacientes com influenza adquirida na comunidade (AKERS *et al.*, 2017). A internação de um paciente com infecção respiratória representa até 59% do custo total para o sistema de saúde, e os 41% restantes são gastos com consumíveis, testes diagnósticos, medicamentos e consulta com especialistas (MARCONE *et al.*, 2015). Desta forma, pode-se pensar que, havendo um bom planejamento o custo do ensaio molecular adequadamente aplicado na triagem de infecções respiratórias poderá ser compensatório se racionalizar os custos com internação.

5 CONCLUSÃO

Apesar da análise estatística apresentar uma concordância aceitável foram identificadas 13 amostras com resultados negativos para a IFD, nas quais foram detectados patógenos virais pelo método XGen Multi PR21, o que caracteriza um aumento de sensibilidade do ensaio molecular. No entanto, estudos adicionais de custos são necessários para fins de análise de qual a melhor estratégia laboratorial a ser implantada dependendo da rotina de fluxo e manejo dos pacientes para a garantia adequada da assistência hospitalar.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

O financiamento se deu através do Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE/HCPA).

REFERÊNCIAS

AKERS, Isabel E. *et al.* Influence of time to diagnosis of severe influenza on antibiotic use, length of stay, isolation precautions, and mortality: a retrospective study. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 337–344, 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/irv.12454>. Acesso em: 14 nov. 2019.

BIONDO, Gabriela Fontanella *et al.* Impact of A/H1N1 influenza in children at a Brazilian University Hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 219–223, 2018.

BRADLEY, John S. *et al.* **The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: Clinical practice guidelines by the pediatric infectious diseases society and the infectious diseases society of America.** [S. l.: s. n.]

BRASIL. **Situação Epidemiológica da Influenza no Brasil, Até A Semana Epidemiológica 32 de 2017: Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico nº SE 32.** Brasília-BR [s. n.] Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

BURD, Eileen M. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 550–576, 2010. Disponível em: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00074-09>

CARVALHO, Cristina Valetta; DE - RICCI, Giannina; AFFONSO, Regina. **Guia de Práticas em Biologia Molecular.** 2. ed. [S. l.: s. n.]

CEPHEID. **Cepheid Announces FDA Clearance Of Xpert® Xpress Flu And Xpert Xpress Flu/RSV.** [s. l.], 2018. Disponível em: <http://www.cepheid.com/us/about-us/news-events/press-releases/217-cepheid-announces-fda-clearance-of-xpert-xpress-flu-and-xpert-xpress-flu-rsv>. Acesso em: 21 set. 2018.

CHEN, JH *et al.* Evaluation of the molecular Xpert Xpress Flu/RSV assay vs. Alere i Influenza A & B assay for rapid detection of influenza viruses. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 90, n. 3, p. 177–180, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889317303735>

COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES. Recommendations for prevention and control of influenza in children, 2016-2017. **Pediatrics**, [S. l.], v. 138,

n. 4, 2016.

COUCEIRO, José Nelson dos Santos Silva; MENDES, Gabriela da Silva; SILVA, Raquel Cirlene da. Viroses respiratórias. *In: GUANABARA KOOGAN (org.). Virologia humana*. 3. ed. Rio de Janeiro [s. n.]. p. 657–757.

DAS, Shubhagata; DUNBAR, Sherry; TANG, Yi-Wei. Laboratory Diagnosis of Respiratory Tract Infections in Children – the State of the Art. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. OCT, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02478/full>. Acesso em: 7 nov. 2019.

DILNESSA, T., ZELEKE, H. Cell culture, cytopathic effect and immunofluorescence diagnosis of viral infection. **J. Microbiol. Mod. Tech.**, [S. l.], n. 2, p. 102–110, 2017. Disponível em: <http://www.annexpublishers.co/full-text/JMC/2102/Cell-Culture-Cytopathic-Effect-and-Immunofluorescence-Diagnosis-of-Viral-Infection.php>

DRYSDALE, Simon B.; GREEN, Christopher A.; SANDE, Charles J. Best practice in the prevention and management of paediatric respiratory syncytial virus infection. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 63–71, 2016.

GINOCCHIO, Christine C. **Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods**. [S. l.: s. n.]

GOINS, William P.; TALBOT, H. Keipp; TALBOT, Thomas R. **Health Care-Acquired Viral Respiratory Diseases**. [S. l.: s. n.]

HEMATIAN, Ali *et al.* Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. **Osong Public Health and Research Perspectives**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 77–82, 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210909915300886>. Acesso em: 12 nov. 2019.

HODINKA, Richard L.; KAISER, Laurent. **Is the era of viral culture over in the clinical microbiology laboratory?**. [S. l.: s. n.]

JOKELA, P. *et al.* Detection of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by duplex real-time RT-PCR assay in comparison with direct fluorescent assay. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 1568–1573, 2010.

KAMEDA, Koichi; CORRÊA, Marilena C. D. V.; CASSIER, Maurice. A incorporação do teste diagnóstico baseado na amplificação de ácidos nucleicos

(NAT) para triagem de sangue no SUS: arranjos tecnológicos para a nacionalização do “NAT brasileiro”. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, [S. l.], v. 28, n. 1, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-73312018000100405&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 30 jan. 2020.

KUYPERS, Jane *et al.* Comparison of Real-Time PCR Assays with Fluorescent-Antibody Assays for Diagnosis of Respiratory Virus Infections in Children. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 44, n. 7, p. 2382–2388, 2006. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00216-06>. Acesso em: 13 nov. 2019.

LANDIS, J. Richard; KOCH, Gary G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 159, 1977. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/2529310?origin=crossref>

LI, You *et al.* Global patterns in monthly activity of influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and metapneumovirus: a systematic analysis. **The Lancet Global Health**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. e1031–e1045, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X19302645>

MACKAY, I. M. *et al.* Real-time PCR; History and Fluorogenic Chemistries. In: MACKAY, I. M. (org.). **Real-Time PCR in Microbiology From diagnosis to characterization**. 1. ed. United Kingdom: Horizon Press - Calister Academic Press, 2007. p. 1–40. *E-book*. Disponível em: <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:137077>

MAHONY, James B. Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 716–747, 2008. Disponível em: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00037-07>. Acesso em: 12 nov. 2019.

MARCONE, Débora Natalia *et al.* Incidence of viral respiratory infections in a prospective cohort of outpatient and hospitalized children aged ≤ 5 years and its associated cost in Buenos Aires, Argentina. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 447, 2015. Disponível em: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-1213-4>

MARIMÓN, José María; NAVARRO-MARÍ, José María. Métodos de diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 108–115, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X16303871>. Acesso em: 7 nov. 2019.

PELT-VERKUIL, Elizabeth van; BELKUM, Alex van; HAYS, John P. Variants and Adaptations of the Standard PCR Protocol. *In: Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. [S. l.]: Springer, Dordrecht, 2008. p. 231–276.

PUERARI, Diane *et al.* Aplicação de teste molecular para detecção de adenovírus em pacientes pediátricos distintos. **Revista Paulista de Pediatria**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 136–141, 2015.

ROINGEARD, Philippe. Viral detection by electron microscopy: past, present and future. **Biology of the Cell**, [S. l.], v. 100, n. 8, p. 491–501, 2008. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1042/BC20070173>. Acesso em: 12 dez. 2019.

SAIKI, Randall K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 230, n. 4732, p. 1350–4, 1985. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999980>. Acesso em: 30 jan. 2020.

SALEZ, Nicolas *et al.* Prospective and retrospective evaluation of the Cepheid Xpert® Flu/RSV XC assay for rapid detection of influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 81, n. 4, p. 256–258, 2015.

SAWATWONG, Pongpun *et al.* **Serology as an adjunct to polymerase chain reaction assays for surveillance of acute respiratory virus infections**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cir710>. Acesso em: 30 jan. 2020.

SCHOT, Marjolein J. C. *et al.* Diagnostic value of signs, symptoms and diagnostic tests for diagnosing pneumonia in ambulant children in developed countries: a systematic review. **npj Primary Care Respiratory Medicine**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 40, 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41533-018-0104-8>. Acesso em: 4 out. 2019.

SCOTTA, Marcelo Comerlato *et al.* Respiratory viral coinfection and disease severity in children: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Virology**, [S. l.], v. 80, p. 45–56, 2016.

SHI, Ting *et al.* Aetiological role of common respiratory viruses in acute lower respiratory infections in children under five years: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Global Health**, [S. l.], v. 5, n. 1, 2015. Disponível em: <http://www.jogh.org/documents/issue201501/jogh-05-010408.pdf>

STEENSELS, Deborah *et al.* Performance evaluation of direct fluorescent

antibody, Focus Diagnostics Simplexa™ Flu A/B & RSV and multi-parameter customized respiratory Taqman® array card in immunocompromised patients. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 245, p. 61–65, 2017.

TROEGER, Christopher *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 18, n. 11, p. 1191–1210, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918303104>

WHO. **Children: reducing mortality**. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/children-reducing-mortality>. Acesso em: 26 out. 2019.

WISHAAPT, Jérôme O.; VERSTEEGH, Florens G. A.; HARTWIG, Nico G. PCR testing for Paediatric Acute Respiratory Tract Infections. **Paediatric Respiratory Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 43–48, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526054214000803>. Acesso em: 13 nov. 2019.

ZHENG, Xue-yan *et al.* Regional, age and respiratory-secretion-specific prevalence of respiratory viruses associated with asthma exacerbation: a literature review. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 163, n. 4, p. 845–853, 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-017-3700-y>. Acesso em: 30 jan. 2020.

ZUMLA, Alimuddin *et al.* **Rapid point of care diagnostic tests for viral and bacterial respiratory tract infections-needs, advances, and future prospects**. [S. l.]: Lancet Publishing Group, 2014.

6. Considerações finais

Um estudo ideal de validação necessita ainda de um tamanho amostral maior do que o utilizado e investimentos na aquisição de kits, para que os resultados possam ser mais bem avaliados, por isso identificamos que o tamanho amostral e a forma de seleção das mesmas contribuíram para um viés no presente trabalho. A correlação entre as técnicas moleculares e a imunofluorescência é dificultada em função de seus princípios metodológicos serem intrinsicamente diferentes. O ensaio XGen Multi PR21 foi avaliado no laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Diagnóstico Laboratorial do HCPA com o objetivo de oferecer a assistência um teste diagnóstico de vírus respiratório com maior sensibilidade e especificidade, comparado ao teste de rotina atual (IFD). Apesar de esse estudo informar que o método avaliado apresenta qualidade superior ao teste atualmente oferecido, a implantação deste novo método depende ainda de um processo de avaliação de custo-efetividade.

Este estudo é um início para estimular a busca por atualização nas técnicas diagnósticas aplicadas nos laboratórios de análise clínicas, visando sempre à garantia da qualidade na assistência ao paciente.

REFERÊNCIAS

AKERS, Isabel E. *et al.* Influence of time to diagnosis of severe influenza on antibiotic use, length of stay, isolation precautions, and mortality: a retrospective study. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 337–344, 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/irv.12454>. Acesso em: 14 nov. 2019.

BIONDO, Gabriela Fontanella *et al.* Impact of A/H1N1 influenza in children at a Brazilian University Hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 219–223, 2018.

BRADLEY, John S. *et al.* **The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: Clinical practice guidelines by the pediatric infectious diseases society and the infectious diseases society of America.** [S. l.: s. n.]

BRASIL. **Situação Epidemiológica da Influenza no Brasil, Até A Semana Epidemiológica 32 de 2017: Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico nº SE 32.** Brasília-BR [s. n.] Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

BURD, Eileen M. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 550–576, 2010. Disponível em: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00074-09>

CARVALHO, Cristina Valetta; DE - RICCI, Giannina; AFFONSO, Regina. **Guia de Práticas em Biologia Molecular.** 2. ed. [S. l.: s. n.]

CEPHEID. **Cepheid Announces FDA Clearance Of Xpert® Xpress Flu And Xpert Xpress Flu/RSV.** [s. l.], 2018. Disponível em: <http://www.cepheid.com/us/about-us/news-events/press-releases/217-cepheid-announces-fda-clearance-of-xpert-xpress-flu-and-xpert-xpress-flu-rsv>. Acesso em: 21 set. 2018.

CHEN, JH *et al.* Evaluation of the molecular Xpert Xpress Flu/RSV assay vs. Alere i Influenza A & B assay for rapid detection of influenza viruses. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 90, n. 3, p. 177–180, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889317303735>

COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES. Recommendations for prevention and control of influenza in children, 2016-2017. **Pediatrics**, [S. l.], v. 138, n. 4, 2016.

COUCEIRO, José Nelson dos Santos Silva; MENDES, Gabriela da Silva; SILVA, Raquel Cirlene da. **Viroses respiratórias.** In: GUANABARA KOOGAN (org.). **Virologia humana.** 3. ed. Rio de Janeiro [s. n.], p. 657–757.

DAS, Shubhagata; DUNBAR, Sherry; TANG, Yi-Wei. Laboratory Diagnosis of Respiratory Tract Infections in Children – the State of the Art. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. OCT, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02478/full>. Acesso em: 7 nov.

2019.

DILNESSA, T., ZELEKE, H. Cell culture, cytopathic effect and immunofluorescence diagnosis of viral infection. **J. Microbiol. Mod. Tech.**, [S. l.], n. 2, p. 102–110, 2017. Disponível em: <http://www.annepublishers.co/full-text/JMC/2102/Cell-Culture-Cytopathic-Effect-and-Immunofluorescence-Diagnosis-of-Viral-Infection.php>

DRYSDALE, Simon B.; GREEN, Christopher A.; SANDE, Charles J. Best practice in the prevention and management of paediatric respiratory syncytial virus infection. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 63–71, 2016.

GINOCCHIO, Christine C. **Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods.** [S. l.: s. n.]

GOINS, William P.; TALBOT, H. Keipp; TALBOT, Thomas R. **Health Care-Acquired Viral Respiratory Diseases.** [S. l.: s. n.]

HEMATIAN, Ali *et al.* Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. **Osong Public Health and Research Perspectives**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 77–82, 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210909915300886>. Acesso em: 12 nov. 2019.

HODINKA, Richard L.; KAISER, Laurent. **Is the era of viral culture over in the clinical microbiology laboratory?** [S. l.: s. n.]

JOKELA, P. *et al.* Detection of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by duplex real-time RT-PCR assay in comparison with direct fluorescent assay. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 1568–1573, 2010.

KAMEDA, Koichi; CORRÊA, Marilena C. D. V.; CASSIER, Maurice. A incorporação do teste diagnóstico baseado na amplificação de ácidos nucleicos (NAT) para triagem de sangue no SUS: arranjos tecnológicos para a nacionalização do “NAT brasileiro”. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, [S. l.], v. 28, n. 1, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-73312018000100405&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 30 jan. 2020.

KUYPERS, Jane *et al.* Comparison of Real-Time PCR Assays with Fluorescent-Antibody Assays for Diagnosis of Respiratory Virus Infections in Children. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 44, n. 7, p. 2382–2388, 2006. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00216-06>. Acesso em: 13 nov. 2019.

LANDIS, J. Richard; KOCH, Gary G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 159, 1977. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/2529310?origin=crossref>

LI, You *et al.* Global patterns in monthly activity of influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and metapneumovirus: a systematic analysis. **The Lancet Global Health**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. e1031–e1045, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X19302645>

MACKAY, I. M. *et al.* Real-time PCR; History and Fluorogenic Chemistries. *In*: MACKAY, I. M. (org.). **Real-Time PCR in Microbiology From diagnosis to characterization**. 1. ed. United Kingdom: Horizon Press - Calister Academic Press, 2007. p. 1–40. *E-book*. Disponível em: <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:137077>

MAHONY, James B. Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 716–747, 2008. Disponível em: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00037-07>. Acesso em: 12 nov. 2019.

MARCONE, Débora Natalia *et al.* Incidence of viral respiratory infections in a prospective cohort of outpatient and hospitalized children aged ≤ 5 years and its associated cost in Buenos Aires, Argentina. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 447, 2015. Disponível em: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-1213-4>

MARIMÓN, José María; NAVARRO-MARÍ, José María. Métodos de diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 108–115, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X16303871>. Acesso em: 7 nov. 2019.

PELT-VERKUIL, Elizabeth van; BELKUM, Alex van; HAYS, John P. Variants and Adaptations of the Standard PCR Protocol. *In*: **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification**. [S. l.]: Springer, Dordrecht, 2008. p. 231–276.

PUERARI, Diane *et al.* Aplicação de teste molecular para detecção de adenovírus em pacientes pediátricos distintos. **Revista Paulista de Pediatria**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 136–141, 2015.

ROINGEARD, Philippe. Viral detection by electron microscopy: past, present and future. **Biology of the Cell**, [S. l.], v. 100, n. 8, p. 491–501, 2008. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1042/BC20070173>. Acesso em: 12 dez. 2019.

SAIKI, Randall K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 230, n. 4732, p. 1350–4, 1985. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999980>. Acesso em: 30 jan. 2020.

SALEZ, Nicolas *et al.* Prospective and retrospective evaluation of the Cepheid Xpert® Flu/RSV XC assay for rapid detection of influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 81, n. 4, p. 256–258, 2015.

SAWATWONG, Pongpun *et al.* **Serology as an adjunct to polymerase chain reaction assays for surveillance of acute respiratory virus infections**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cir710>. Acesso em: 30 jan. 2020.

SCHOT, Marjolein J. C. *et al.* Diagnostic value of signs, symptoms and diagnostic tests for diagnosing pneumonia in ambulant children in developed countries: a systematic review. **npj Primary Care Respiratory Medicine**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 40, 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41533-018->

0104-8. Acesso em: 4 out. 2019.

SCOTTA, Marcelo Comerlato *et al.* Respiratory viral coinfection and disease severity in children: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Virology**, [S. l.], v. 80, p. 45–56, 2016.

SHI, Ting *et al.* Aetiological role of common respiratory viruses in acute lower respiratory infections in children under five years: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Global Health**, [S. l.], v. 5, n. 1, 2015. Disponível em: <http://www.jogh.org/documents/issue201501/jogh-05-010408.pdf>

STEENSELS, Deborah *et al.* Performance evaluation of direct fluorescent antibody, Focus Diagnostics Simplexa™ Flu A/B & RSV and multi-parameter customized respiratory Taqman® array card in immunocompromised patients. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 245, p. 61–65, 2017.

TROEGER, Christopher *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 18, n. 11, p. 1191–1210, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918303104>

WHO. **Children: reducing mortality**. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/children-reducing-mortality>. Acesso em: 26 out. 2019.

WISHAUPT, Jérôme O.; VERSTEEGH, Florens G. A.; HARTWIG, Nico G. PCR testing for Paediatric Acute Respiratory Tract Infections. **Paediatric Respiratory Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 43–48, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526054214000803>. Acesso em: 13 nov. 2019.

ZHENG, Xue-yan *et al.* Regional, age and respiratory-secretion-specific prevalence of respiratory viruses associated with asthma exacerbation: a literature review. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 163, n. 4, p. 845–853, 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-017-3700-y>. Acesso em: 30 jan. 2020.

ZUMLA, Alimuddin *et al.* **Rapid point of care diagnostic tests for viral and bacterial respiratory tract infections-needs, advances, and future prospects**. [S. l.]: Lancet Publishing Group, 2014.

ANEXO 2

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL ;
HCPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Implantação de técnica molecular na pesquisa de vírus respiratórios

Pesquisador: Ana Paula Alegretti

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 15338919.5.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.529.453

Apresentação do Projeto:

Neste projeto os autores pretendem validar a técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico de alguns vírus respiratórios extraídos de secreções de nasofaringe. Atualmente existem poucas opções de exames laboratoriais para vírus respiratórios com elevada sensibilidade e especificidade. O cultivo direto de vírus para diagnóstico é demorado e pouco efetivo e, a imunofluorescência direta (técnica atualmente utilizada) apresenta baixa sensibilidade. Existem ainda alguns testes moleculares disponíveis comercialmente para um painel específico de vírus, mas apresentam alto custo financeiro.

Portanto justifica-se a validação de um teste rápido de RT-qPCR automatizado in house para um painel restrito para diagnóstico de adenovírus humano, influenza A, influenza B, parainfluenza do tipo 3 e vírus sincicial respiratório de pacientes com suspeita de infecções virais respiratórias em amostras de aspirado de nasofaringe comparando com a metodologia de imunofluorescência direta de uso atualmente.

Objetivo da Pesquisa:

Geral

Propor uma estratégia de fluxo para o diagnóstico laboratorial de infecções virais respiratórias em amostras de aspirado de nasofaringe, iniciando com um teste rápido e em caso de resultados negativos, mas com clínica persistente, faz-se um painel estendido de vírus

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL
HCPA



Continuação do Parecer: 3.529.453

respiratórios. Desta forma, o objetivo é validar a técnica in house qualitativa de PCR em tempo real associada à transcriptase reversa (RTqPCR), além de avaliar a metodologia Xpert® Xpress FLU/RSV, comparando com o exame de IFD realizado hoje na prática do Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Específicos

- Definir as sequências genômicas alvos para detecção dos principais vírus respiratórios através do ensaio de RT-qPCR (Influenza A, Influenza B, Parainfluenza tipo 3, Vírus Sincicial Respiratório e Adenovírus);
- Construir uma curva de eficiência das reações para cada alvo pesquisado pela técnica in house;
- Determinar a concentração de uso dos primers e a temperatura de melting adequada para cada alvo pesquisado;
- Comprovar a especificidade in silico e experimental dos alvos estudados pela técnica in house;
- Determinar os limites de detecção para cada um dos alvos estudados pela técnica in house;
- Realizar as análises a partir de um banco de material biológico pela técnica de RT-qPCR in house e pelo ensaio sistema fechado Xpert® Xpress FLU/RSV;
- Comparar os resultados obtidos pela técnica de IFD atualmente utilizada no laboratório, com os resultados encontrados pelas técnicas RT-qPCR in house e Xpert® Xpress FLU/RSV;
- Implantar as técnicas moleculares validadas na rotina do Laboratório de Biologia Molecular (Unidade de Diagnóstico Especializado - Serviço de Diagnóstico Laboratorial - Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

O estudo não apresenta riscos aos pacientes que farão parte da pesquisa, em vista que, os materiais clínicos utilizados seriam descartados. Além de que, não serão solicitados em nenhum momento outros exames aos pacientes e, os dados serão tratados com total respeito e sigilo, estando de acordo com a Resolução 466 de 2012.

Benefícios

Considerando a complexidade atendida no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e o atendimento prestado ser voltado ao Sistema Único de Saúde (SUS), este trabalho trará um reflexo muito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL
HCPA



Continuação do Parecer: 3.529.453

positivo à assistência ao paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um trabalho de conclusão da residência onde os autores realizarão a validação do diagnóstico dos vírus Influenza A, Vírus Influenza B, Parainfluenza tipo 3, Vírus Sincicial Respiratório e Adenovírus por técnicas moleculares de RT-qPCR. Normalmente o diagnóstico é realizado por imunofluorescência direta e apresenta uma série de desvantagens, incluindo baixa sensibilidade. Serão utilizadas amostras de secreção de nasofaringe de pacientes com suspeita de infecção viral respiratória (confirmados pelo exame de imunofluorescência direta utilizado na rotina) e amostras negativas para infecção. O projeto será realizado na Unidade de Diagnóstico Especializado – Serviço de Diagnóstico Laboratorial do HCPA.

O projeto tem desenho claro, está bem fundamentado e é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os autores solicitam dispensa do TCLE. Trata-se de projeto de validação de metodologia analítica de diagnóstico molecular. Fará uso de amostras biológicas (secreção de nasofaringe) coletadas na rotina e normalmente descartadas. Solicita uso de dados de prontuário.

Apresenta termos de compromisso dos pesquisadores.

Recomendações:

Nada a recomendar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 3.460.139 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 02/08/2019. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (projeto versão de 02/08/2019 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL ;
HCPA**



Continuação do Parecer: 3.529.453

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de 120 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto ou do Plano de Recrutamento apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.
- d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- e) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1332095.pdf	02/08/2019 18:34:08		Aceito
Outros	Respostas_pendencias_CEP_versao3.docx	02/08/2019 18:33:31	LUANA SOARES MARTINEZ	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TCUMB_2019_0249_anapaula.pdf	02/08/2019 18:32:35	LUANA SOARES MARTINEZ	Aceito
Outros	TCUD_2019_0249_anapaula.pdf	02/08/2019 18:32:22	LUANA SOARES MARTINEZ	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TCUMB_2019_0249_RODRIGO.pdf	02/08/2019 18:31:36	LUANA SOARES MARTINEZ	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL
HCPA



Continuação do Parecer: 3.529.453

Outros	TCUD_2019_0249_RODRIGO.pdf	02/08/2019 18:30:01	LUANA SOARES MARTINEZ	Aceito
Outros	TCUD_2019_0249_AHGUSEP.pdf	25/06/2019 09:28:45	LUANA SOARES MARTINEZ	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TCUMB_2019_0249_AHGUSEP.pdf	25/06/2019 09:27:05	LUANA SOARES MARTINEZ	Aceito
Outros	Delegacao_de_funcoes_20192.pdf	10/06/2019 10:18:24	LUANA SOARES MARTINEZ	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_TCR_VR.pdf	03/06/2019 12:11:49	LUANA SOARES MARTINEZ	Aceito
Orçamento	PROJETO_TCR_ORCAMENTO.pdf	03/05/2019 17:22:21	LUANA SOARES MARTINEZ	Aceito
Cronograma	PROJETO_TCR_CRONOGRAMA.pdf	03/05/2019 17:21:48	LUANA SOARES MARTINEZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_TCR.pdf	03/05/2019 17:20:34	LUANA SOARES MARTINEZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 23 de Agosto de 2019

Assinado por:
José Roberto Goldim
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br