

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELISA DAHMER KILPP

Detecção de infecções respiratórias utilizando a técnica de PCR Multiplex: Uma
revisão

CURITIBA

2019

ELISA DAHMER KILPP

Detecção de infecções respiratórias utilizando a técnica de PCR Multiplex: uma
revisão

Trabalho apresentado como requisito parcial
para a conclusão do Curso de Pós-Graduação
em Análises Clínicas, Programa de Pós-
Graduação Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Paraná

Orientador: Dra. Fernanda Bovo

Coorientadora: MSc. Caroline Grisbach Meissner

CURITIBA

2019

RESUMO

As infecções respiratórias virais são importante problema de saúde pública mundial tanto pela alta mortalidade em pacientes, principalmente imunossuprimidos, como pelo impacto econômico que causa em todo o mundo. O objetivo desse trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica comparando as diferentes técnicas de biologia moleculares encontradas na literatura e aplicadas em diagnósticos de doenças respiratórias. Foram encontradas diversas técnicas e pode-se verificar as vantagens e desvantagens das principais. Pode-se verificar que diagnóstico correto e rápido das infecções respiratórias virais é de extrema importância para a correta prescrição do antiviral e melhor prognóstico da doença, uma vez que o início do tratamento precoce, com antivirais adequados, contribui para a redução dos sintomas e gravidade da doença o que pode contribuir para um aumento na qualidade de vida dos pacientes acometidos por essas infecções. Assim, com o avanço das técnicas analíticas e com a entrada da biologia molecular em diagnósticos houve um refinamento do diagnósticos dessas infecções o que por consequência trouxe melhorias para os tratamentos que passaram a se iniciarem mais rapidamente e serem mais singulares para cada infecção.

Palavras-chave: PCR multiplex, infecção respiratória viral, Influenza PCR.

ABSTRACT

Viral respiratory infections are an important global public health problem in part because of high mortality in patients, mainly immunosuppressed patients, and in part because of the economic impact it causes worldwide. The aim of this work was to carry out a bibliographic review comparing the different molecular biology techniques found in the literature and applied in diagnoses of respiratory diseases. Several techniques have been found and in this research its possible to verify the advantages and disadvantages of the main ones. It can be verified that correct and rapid diagnosis of viral respiratory infections is of extreme importance for the correct prescription of the antiviral and better prognosis of the disease, since the beginning of the early treatment, with adequate antivirals, contributes to the reduction of the symptoms and severity of the disease, which may contribute to an increase in the quality of life of the patients affected by these infections. Thus, with the advancement of analytical techniques and the entry of molecular biology into diagnoses, there was a refinement of the diagnoses of these infections, which consequently brought improvements to the treatments that started to start faster and were more unique for each infection..

Key words: Multiplex PCR, viral respiratory infection, PCR, Influenza.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 JUSTIFICATIVA.....	8
3 OBJETIVOS.....	8
3.1 OBJETIVO GERAL	8
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4 METODOLOGIA	9
5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
6 DISCUSSÃO	18
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
REFERÊNCIAS.....	21

1 INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias virais apresentam-se entre as principais causas de atendimentos médicos em todo o mundo, exercendo um grande impacto econômico no sistema de saúde, tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos. Além disso, contribuem para elevadas taxas de mortalidades na infância e na fase senil (MS, 2010).

O diagnóstico clínico das doenças respiratórias virais constitui um desafio para os clínicos, devido a possibilidade de sobreposição dos sinais e sintomas das diferentes doenças virais, o que dificulta o diagnóstico clínico preciso. Ressalta-se ainda que agentes bacterianos também podem causar doenças respiratórias com sintomas semelhantes às virais, levando frequentemente ao uso excessivo de antibióticos inapropriados (MENGELLE et al, 2014).

O diagnóstico rápido e preciso das infecções é de extrema importância para a correta prescrição do antiviral e melhor prognóstico da doença, uma vez que o início do tratamento precoce, com antivirais adequados, contribui para a redução dos sintomas e gravidade da doença que, conseqüentemente, reduz a extensão da doença (MENGELLE et al, 2014). Com isso, diagnósticos moleculares como a reação da cadeia da polimerase, usando técnicas “*in-house*” ou comerciais são a melhor alternativa para obter resultados mais sensíveis e específicos, diminuindo tempo de hospitalização, infecções hospitalares e gastos desnecessários (JUNIOR et al, 2014).

Os laboratórios de virologia têm usado historicamente métodos tradicionais, como cultura, imunofluorescência (IF) e imunoensaio para o diagnóstico de infecções respiratórias. A IF oferece um retorno rápido de resultado, mas é um exame considerado subjetivo e requer anticorpos monoclonais específicos e tem uma baixa sensibilidade para a detecção de alguns vírus como adenovírus. A cultura oferece um tempo de resposta lento, principalmente para laboratórios com grandes volumes de amostras. Os imunoensaios enzimáticos têm sido utilizados para detecção do vírus Influenza e vírus sincicial respiratório porém apresentam uma sensibilidade baixa de 50 a 70% (MAHONY, 2009).

Atualmente, com o avanço do diagnóstico através da nova era de metodologia moleculares, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), houve um aumento da sensibilidade, especificidade e acurácia em relação aos demais testes anteriormente realizados, como o teste rápido ou a imunofluorescência (MENGELLE, 2014).

A qPCR consiste na extração do ácido nucléico, amplificação e detecção do material genético alvo. Assim, devido a sabida pluralidade de patógenos envolvidos nas doenças respiratórias virais, bem como o difícil diagnóstico rápido assertivo em tais infecções, onde o tempo de diagnóstico pode fazer uma diferença significativa na vida dos pacientes, o uso da qPCR multiplex como método de diagnóstico vem contribuindo muito para a promoção de saúde e para a implementação de análises precisas e de qualidade dos patógenos das infecções, uma vez que diminuiu consideravelmente o custo e o tempo da PCR convencional, antes utilizada (MENGELLE et al, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Um diagnóstico de qualidade está relacionado com qualidade de saúde e de vida portanto uma análise laboratorial molecular adequada e de alta precisão em doenças virais podem ser diferenciais tanto no sistema público como no sistema privado de saúde de um modo geral. O uso de metodologias como a qPCR multiplex, tem contribuído para a diminuição dos custos no manejo do paciente e uma maior precisão dos diagnósticos, auxiliando no uso correto de medicamentos como antibióticos.

Assim, esse trabalho visa fazer uma revisão bibliográfica mostrando as principais vantagens e desvantagens das detecções das infecções virais por qPCR multiplex.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão da literatura, abordando os tópicos de metodologia no diagnóstico de infecções por vírus respiratórios por qPCRs Multiplex.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Abordar as principais vantagens da utilização de qPCRs Multiplex para diagnóstico de infecções virais respiratórias;
- Relatar as principais dificuldades na implementação de qPCRs Multiplex como rotina nos sistemas de saúde.

4 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo bibliográfico retrospectivo sobre os diagnósticos realizados para infecção respiratória aguda utilizando a técnica de PCR multiplex.

Através de levantamento bibliográfico, mediante consulta às bases de dados MedlinePubMed (US. National Library of Medicine National Institutes of Health, USA), SciELOBrazil (Scientific Electronic Library Online) foi realizada uma pesquisa de publicações sobre infecções respiratórias e diagnóstico por PCR em tempo real multiplex sem preferências de ano de publicação usando as palavras chaves: *'multiplex pcr, respiratory infection pcr, Influenza'* e foram selecionados 19 artigos. Além disto, foi realizada consulta a 3 boletins e guias do Ministério da Saúde e 1 tese de doutorado e 1 dissertação.

5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As infecções respiratórias agudas são importante problema de saúde pública a nível mundial, pela alta mortalidade, especialmente em pacientes imunodeprimidos. Nos Estados Unidos, o *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* divulgou em 2010 uma nota que no período de 1976 e 2007 a variação de óbitos por doença respiratória foi de 1,4 a 16,1 a cada 100.000 pessoas (CDC, 2010). No Brasil, estima-se que em 2016 quase 2 mil pessoas foram a óbitos por conta do vírus H1N1 (BRASIL, 2016). A doença respiratória viral é a principal causa de atendimento médico em todo o mundo exercendo um grande impacto econômico no sistema de saúde. Tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos contribuem para elevada taxa de mortalidade na infância e na fase senil (MS, 2010). Os sinais e sintomas clínicos das doenças respiratórias são comuns entres os vírus e até quando se trata de infecção bacteriana, levando a um diagnóstico difícil baseado na clínica e um uso excessivo de antibióticos.

Ressalta-se que alguns fatores podem contribuir significativamente para a diminuição da mortalidade por infecções respiratórias virais. Dentre eles, pode-se citar fatores como o rápido e eficaz diagnóstico, o tratamento assertivo com antivirais adequados. Tudo isso corrobora para a diminuição da duração dos sintomas, a diminuição da gravidade da doença bem como menor número de complicações, como pneumonias e outras doenças pulmonares. (BABADY, 2018). Na figura 1 estão listados os principais vírus, causadores de infecções respiratórias, características taxonômicas, sintomas e quando existem, terapias específicas.

Tabela 1. Características taxonômicas, sintomas mais comuns dos vírus causadores de infecções respiratórias mais comuns.

VÍRUS	FAMÍLIA	GENOMA	SUBTIPOS	SINTOMAS DA DOENÇA
ADENOVÍRUS HUMANO	<i>Adenoviridae</i>	dsDNA linear	>50 sorotipos com diferentes apresentações de doenças	Infecção do trato respiratório, gastroenterite, conjuntivite, cistite hemorrágica, hepatite, colite hemorrágica
BOCAVIRUS (E17)	hbOV <i>Parvoviridae</i>	ssDNA linear	Sorotipos 1-4	Infecção do Trato Respiratório Baixo (HBoV 1), infecções gastrointestinais (HBoV2-4), asma
CORONAVÍRUS	<i>Coronaviridae</i>	ssRNA linear	229E, NL63.HKU1, ME RS, SARS, Oc43,	Pneumonia atípica
INFLUENZA	<i>Orthorixoviridae</i>	ssRNA linear ou segmentado	A, B, C	Febre Alta com dor de cabeça e dor no corpo, sintomas gastrointestinais, infecções bacterianas, raramente encefalites, miosites e miocardites.
METAPNEUMOVÍRUS HUMANO (hMPV)	<i>Paramyxoviridae</i>	ssRNA linear	SUBTIPOS A E B	Segunda maior causa de bronquiolite (depois de RSV), pneumonia.
PARAINFLUENZA	<i>Paramyxoviridae</i>	ssRNA linear	1-4 DIFERENTES PADRÕES SAZONAIS COM	Infecções febris do trato respiratório alto e baixo
RINOVÍRUS	<i>Picornaviridae</i>	ssRNA linear	Mais de 100 sorotipos	Coriza, dor de garganta, tosse.
VÍRUS RESPIRATÓRIO HUMANO (RSV)	<i>Paramyxoviridae</i>	ssRNA linear	Subtipos A e B	Bronquiolite, pneumonia, infecção do trato respiratório alto,

Nota: dsDNA - DNA dupla fita, ssDNA - DNA fita simples, ssRNA - RNA fita simples.

Fonte: Adaptado de Krauze (2014).

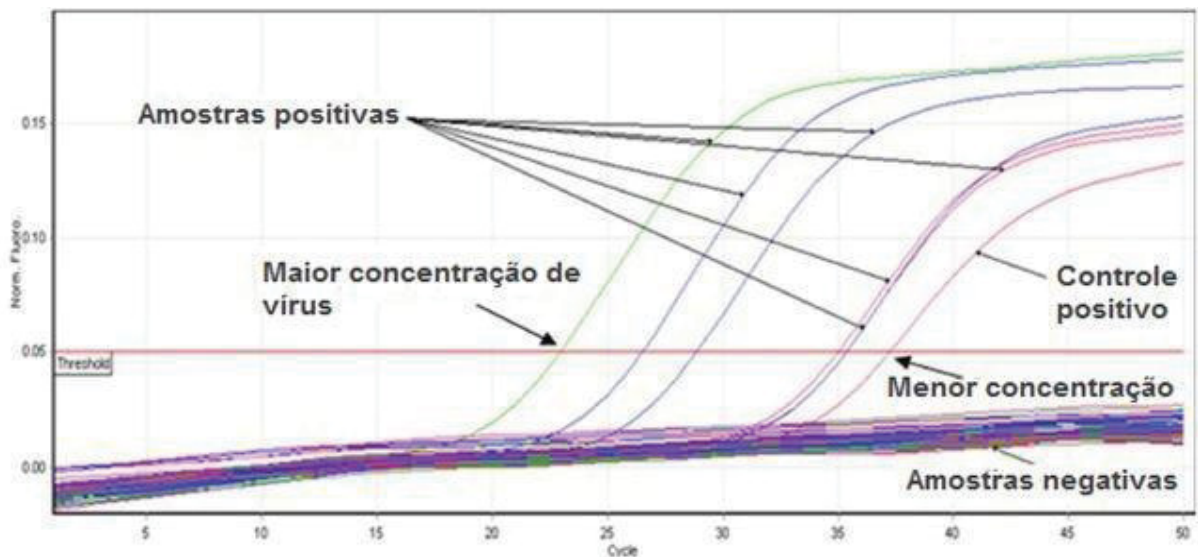
O aprimoramento e disponibilidade de novas técnicas diagnósticas mostram-se de grande importância, uma vez que podem auxiliar os clínicos a um diagnóstico eficaz das infecções virais, concretizando o desfecho do tratamento de um paciente com adequada segurança. É válido ressaltar que um adequado diagnóstico também pode fornecer subsídios fidedignos para estudos epidemiológicos. Destaca-se que a escolha das vacinas para doenças respiratórias virais leva em consideração dados epidemiológicos e notificações das diferentes regiões, o que reforça a correlação e a importância de diagnósticos adequados e dados epidemiológicos fidedignos.

Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular foi possível a identificação de agentes que não eram possíveis pelas técnicas de imunofluorescência (IF). No entanto, o sucesso do ensaio laboratorial depende de vários fatores, como a fase inicial pré-analítica (FURLAN, 2016). A indicação da coleta é até o quinto dia após o aparecimento dos sintomas e o tipo de coleta utilizadas para a qPCR são: coleta de células nasofaríngeas com swab, ou aspirado traqueal, lavado brônquico alveolar todas transportadas com meio de transporte viral em pacientes entubados. Essas amostras podem ser armazenadas em temperatura ambiente, porém, recomenda-se o armazenamento em freezer, com temperatura de no mínimo -20°C para diminuir a degradação dos ácidos nucleicos (DRYSDALE & KELLY, 2018).

Os ensaios de qPCR iniciam com a extração dos ácidos nucleicos (RNA e/ou DNA) em sistema automatizado, seguida da amplificação do material genético utilizando um termociclador, que permite a detecção em tempo real dos agentes-alvo em um único tubo ou poço. O RNA extraído passa pela etapa de transcrição reversa, onde serão sintetizados os filamentos de DNA complementares (cDNA) através da ação da enzima transcriptase reversa. A enzima Taq polimerase *one-step* é comumente utilizada para permitir que a transcrição reversa e a qPCR ocorram simultaneamente (PIERCE E RODINKA, 2012). O teste apresenta basicamente as seguintes fases: desnaturação do DNA/RNA, hibridização da enzima Taq polimerase e extensão da fita complementar utilizando probes/sondas (fluoróforos) e *primers* (sequência de oligonucleotídeos iniciadores) que se ligam a região-alvo e emitem um sinal de fluorescência proporcional à quantidade inicial de DNA ou RNA viral

(DRYSDALE & KELLY, 2018). O resultado é analisado em um software específico e um exemplo pode ser visto na Figura 1. A reta em vermelho denominada *threshold* é estabelecida pelo usuário ou pelo próprio software, indicando o início da fase exponencial de produtos de amplificação. *Cycle threshold* (CT) é o valor relativo aos ciclos em que a curva de amplificação ultrapassa o valor limite selecionado. As curvas de amostras abaixo do *threshold* são consideradas negativas, enquanto que as curvas que ultrapassam este valor são positivas (MARTINS, 2015).

Figura 1. Exemplo de uma curva de qPCR.



Nota: Os números de ciclos estão no eixo x e a quantidade de fluorescência produzida na amplificação está no eixo y.

Fonte: Modificado de DRYSDALE & KELLY, 2018.

Diferentes protocolos têm sido desenvolvidos para permitir a detecção dos produtos da qPCR ao longo da amplificação. No entanto, todos os protocolos requerem o uso de um termociclador específico de qPCR, bem como capilares de vidro onde se desenvolve a reação em cadeia da polimerase. Estes equipamentos incluem um sistema óptico constituído por uma fonte de iluminação ultravioleta e um detector de fluorescência (OLIVEIRA, 2010).

A complexidade da infecção viral e a possibilidade de mais de 20 diferentes patógenos estarem envolvidos na doença levaram ao desenvolvimento de uma metodologia mais barata e mais rápida do que a qPCR monoplex: a qPCR multiplex. Os métodos de qPCR multiplex permitem testes para diversos patógenos

simultaneamente em uma única análise e, portanto, diminuem custos, tempo de execução, risco de contaminação do operador e erros de operação (KRAUSE et al 2014).

A agência nos Estados Unidos *Food and Drugs Administration* (FDA) aprovaram 4 principais ensaios de patógenos respiratórios de PCR multiplex (DIAZ-DECARO et al, 2018) (Tabela 2). São eles:

- ENSAIO DE *LUMINEX NXTAG RESPIRATORY PATHOGEN PANEL (RPP)*

Um ensaio de PCR qualitativo de alta complexidade baseado em esferas de alto rendimento capaz de detectar uma variedade de patógenos e subtipos tais como: Adenovirus, Rinovirus/Enterovirus, Influenza A (H1 H3) e B, Parainfluenza virus 1,2,3 e 4, Coronavírus HKU1,NL63,229E, OC43,Vírus sincicial respiratório A e B, Metapneumovirus humano e Bocavirus. Bactérias: *Chlamydomphila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*.

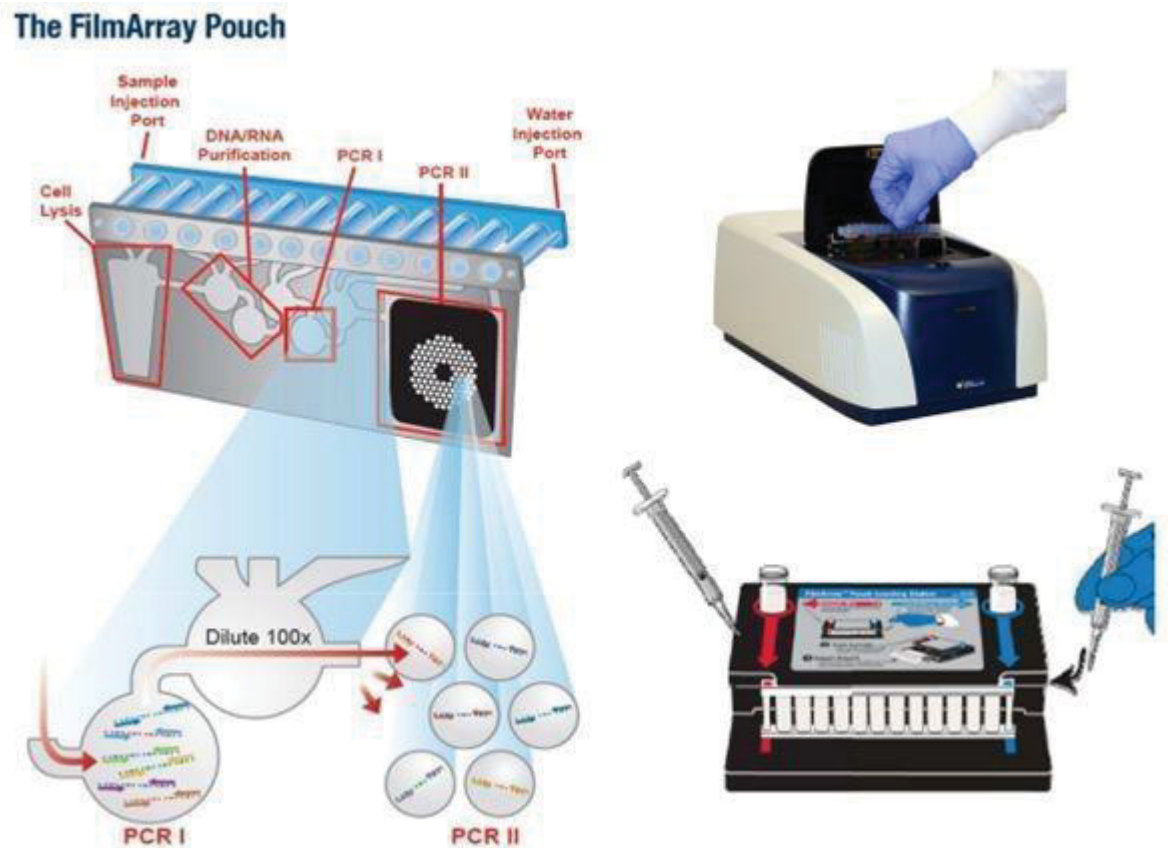
- ENSAIO *DENANOSPHERE VERIGENE RESPIRATORY PANEL (RP) FLEX*

A Verigene é um microarranjo de qPCR multiplex que utiliza uma sonda de nanopartículas de ouro que hibridiza aos amplicons específicos do vírus. É capaz de detectar e identificar simultaneamente Adenovírus, Metapneumovirus Humano, Influenza A (subtipo H3 e H1) Influenza B Parainfluenza 1,2,3 e 4, vírus sincicial respiratório A e B, Rinovirus e as bactérias *Bordetella pertussis* *Bordetella parapertussis/bronchiseptica* *Bordetella holmesii*. Para influenza A subtipo H1N1 é possível determinar a presença da mutação no gene da neuroaminidase, responsável por gerar resistência ao medicamento oseltamivir.

- ENSAIO DE *BIOFIRE FILMARRAY RESPIRATORY PANEL (RP)*

O painel respiratório Filmarray é um teste multiplex de ácido nucléico que utiliza DNA para detecção simultânea e identificação dos mesmos patógenos do teste anterior (figura 2).

Figura 2. Esquema do ensaio de *Filmarray*, a direita a placa *Filmarray* e acima o equipamento.



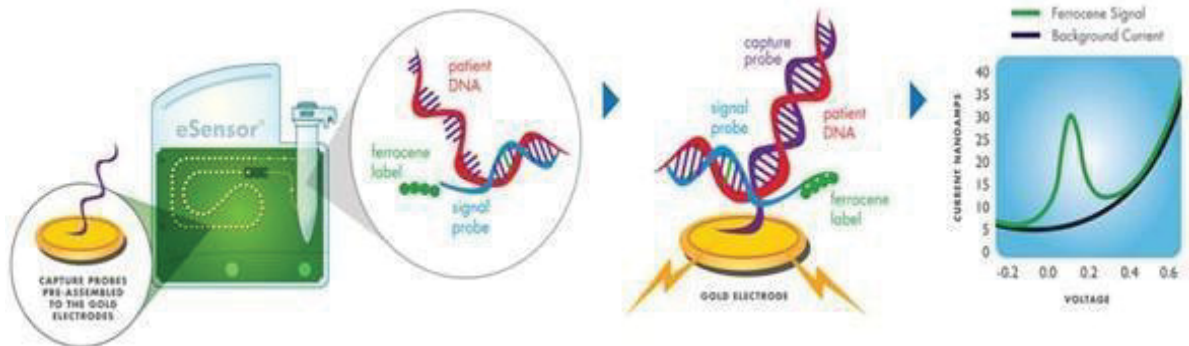
Nota: No canto inferior direito, os reagentes liofilizados, reconstituídos na seta azul e a amostra diluída colocada na seta vermelha, são posteriormente colocados no instrumento ilustrado acima à direita. No lado esquerdo está um esboço do que acontece dentro do equipamento: lise celular, extração e purificação do ácido nucléico, seguido da PCR I, para aumentar a quantidade de material genético, e então a PCR II, que detecta a presença do agente específico.

Fonte: RAND et al (2011).

- **O ENSAIO DE NESENSOR RESPIRATORY VIRAL PANEL (RVP)**

O ensaio é executado em um instrumento modular que pode ser integrado com até três analisadores, que processam 8 amostras cada um e detectam até 14 diferentes tipos virais (DIAS-DECARO et al, 2018). Os complexos de sonda-DNA-alvo presentes na amostra hibridizam com as sondas de captura, trazendo-os perto do eletrodo de ouro. Uma corrente elétrica é aplicada em cada eletrodo e o DNA-alvo capturado é analisado por detecção eletroquímica utilizando voltametria. Um sinal de 3 nA (nano ampere) ou superior por um determinado analito é interpretado como positivo (Figura 3) (PIERCE E RODINKA, 2012).

Figura 3. Esquema do reservatório do eSensor e tecnologia de detecção.



Fonte: PIERCE E RODINKA, 2012.

Tabela 2. Comparação entre as quatro técnicas aprovadas pela FDA.

Nome	Luminex	Verigene	FilmArray	Esensor
Tecnologia utilizada	Esferas de alto rendimento	Nanopartículas de Ouro com sinal prata de amplificação	Análise de curva de melting	Detecção eletroquímica
Patógenos Virais	Adenovírus	Adenovírus	Adenovírus	Adenovírus
	Coronavírus HKU1	Metapneumovírus humano	Coronavírus HKU1	Coronavírus HKU1
	Coronavírus NL63	Rinovírus	Coronavírus NL63	Coronavírus NL63
	Coronavírus 229E	Influenza A, H1, H3,	Coronavírus 229E	Coronavírus 229E
	Coronavírus OC43	Influenza B	Coronavírus OC43	Coronavírus OC43
	Metapneumovírus humano	Parainfluenza 1	Metapneumovírus humano	Metapneumovírus humano
	Rinovírus	Parainfluenza 2	Rinovírus	Rinovírus
	Influenza A, H1, H3, H1-2009	Parainfluenza 3	Influenza A, H1, H3, H1-2009	Influenza A, H1, H3,
	Influenza B	Parainfluenza 4	Influenza B	Influenza B
	Parainfluenza 1	Vírus sincicial respiratório	Parainfluenza 1	Parainfluenza 1
	Parainfluenza 2		Parainfluenza 2	Parainfluenza 2
	Parainfluenza 3		Parainfluenza 3	Parainfluenza 3
	Parainfluenza 4		Parainfluenza 4	Parainfluenza 4
	Vírus sincicial respiratório		Vírus sincicial respiratório	Vírus sincicial respiratório A e B
Bactérias	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Bordetella pertussis</i> , <i>parapertussis/bronchis eptica</i> , <i>holmesii</i>	<i>Bordetella pertussis</i> , <i>parapertussis/bronchis eptica</i> , <i>holmesii</i>	—
Quantidade	até 96 amostras	1 amostra por instrumento	1 amostra por processador	8 amostras por processador
Duração do teste	4 horas	2 horas	2,5 horas	~3 horas

Fonte: O autor (2019)

No Brasil os ensaios de qPCR multiplex para vigilância do vírus Influenza são direcionados pelo Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil, que especificam as metodologias de imunofluorescência e qPCR realizadas pelos laboratórios centrais (LACENs) e os demais laboratórios de referência do país, como Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ), Instituto Evandro Chagas (IEC) e Instituto Adolfo Lutz (IAL) (BRASIL, 2016).

No Paraná, o Laboratório Central do Estado (LACEN-PR) é responsável pela Pesquisa dos Vírus Respiratórios utilizando a metodologia de Biologia Molecular e essa foi implantada para atender os casos de Surtos de Infecção Respiratória e dois programas do Ministério da Saúde: a) Casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), notificados no SINAN; b) Monitoramento ampliado dos Vírus Respiratórios (Programa SIVEP-Gripe) e é possível identificar um painel de nove vírus diferentes, dentre esses 14 subtipos e são eles: Adenovírus humano, Bocavirus humano, Coronavírus humano HKU1, OC43, NL63, Enterovírus, Influenza A e B Metapneumovírus humano, Parainfluenza humano tipo 1, tipo 2, tipo 3, Rinovírus humano e Vírus sincicial respiratório (PARANÁ, 2013).

O método utilizado foi desenvolvido *“in-house”* com primers padronizados pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) e permite a detecção simultânea de 95 amostras. O prazo estipulado pelo manual para liberação do resultado é até 20 dias após o recebimento das amostras.

O guia de Vigilância do Influenza no Brasil padronizou também o envio de 100 amostras por LACENs para o Laboratório de Referência, incluindo amostras inconclusivas, de trabalhadores de avicultura e suinocultura e todas as amostras de óbitos e amostras positivas de indivíduos vacinados recentemente ou em uso de oseltamivir até dois dias depois do início dos sintomas. Esse envio é importante, pois a partir dele as amostras são testadas com o objetivo de identificar quais vírus estão circulando no país e fornecer os dados necessários para a seleção da cepa da vacina para o ano seguinte (BRASIL, 2016).

6 DISCUSSÃO

De fato, o diagnóstico molecular por kit comercial de qPCR multiplex é um dos métodos mais utilizados na maioria dos países para o diagnóstico de infecções respiratórias devido ao custo-benefício, a capacidade de processar um grande número de amostras e a determinação rápida dos resultados para os vírus mais frequentes. Esse método tem demonstrado uma sensibilidade superior para a detecção de vírus respiratórios quando comparado a metodologias tradicionais (FREYMUTH et al. 2006).

Um estudo demonstrou o aumento de 30% a 50% na sensibilidade e especificidade, ou seja, ampliou o número de diagnósticos positivos, quando comparado com imunofluorescência direta e cultura viral (BABADY, 2013). A sensibilidade e especificidade dos testes moleculares é significativamente maior do que a IF (90 a 100% vs 68 a 70%) (BUDNIK, 2016). Um estudo realizado por Mahony (2009) observou uma redução de 291 dólares canadenses (ou 823 reais) no uso da PCR multiplex, quando comparado às técnicas de cultura viral e IF.

Recentemente, PIRALLA e colaboradores (2014) testaram a performance do teste Filmarray em 152 amostras de pacientes recém-natos. Destes, 121 foram positivas para pelo menos um vírus e a taxa de concordância foi de 94% em relação a qPCR *in house*. HUANG e colaboradores divulgaram em uma revisão sistemática que em 5510 amostras de pacientes analisadas por diferentes pesquisadores usando as metodologias Filmarray e Verigene, observou-se um diagnóstico concordante com mais de 95% de sensibilidade para FluA, FluB, RSV e hMPV e 89% para o adenovírus (HUANG, 2017). Loeffelholz et al (2011) compararam o teste *Filmarray Respiratory Panel* e *Prodesse Assay* e não observaram diferença significativa entre as metodologias, exceto pela diminuição da sensibilidade na detecção do adenovírus pelo ensaio *Filmarray*. Analisando a tabela 2, pode-se notar que a técnica de Luminex permite a detecção de um maior número de patógenos respiratórios em uma grande quantidade de amostras. No entanto, a plataforma FilmArray mostra-se mais adequada para laboratórios de pequeno porte, uma vez que detectam mais rapidamente uma grande variedade de

patógenos respiratórios.

No entanto, a realização dos testes moleculares necessita de profissionais altamente capacitados e uma assistência técnica especializada, que podem elevar os custos e aumentar as chances de resultado falso-positivo por contaminação com DNA inespecífico (OLIVEIRA, 2010). Outra discussão recorrente no que se refere a detecção de genoma viral utilizando qPCR multiplex é o real efeito patogênico no momento da análise, visto que alguns vírus podem significar persistência viral sem sintomas respiratórios (PAULLIS et al, 2011). Um estudo com secreções respiratórias de crianças apresentou resultados conflitantes com o adenovírus, tanto infecções repetidas ou persistência viral por tempo estendido enfatizando a necessidade da correlação do diagnóstico laboratorial com a clínica de cada paciente (RODRIGUES et al, 2002).

Embora a qPCR para vírus respiratórios apresente uma especificidade e sensibilidade elevada, ainda há riscos de resultados falso positivos e/ou falso negativos por problemas com contaminação com DNA inespecífico, coleta inadequada, degradação dos ácidos nucleicos, amplificações de regiões inespecíficas, e presença de inibidores da reação. (DRYSDALE & KELLY, 2018).

Um estudo realizado em Vitória-ES comparou as metodologias direcionadas pelo guia e encontrou um aumento de 54,3% na detecção viral em relação a 20,4% de amostras positivas pelo teste de imunofluorescência (IF). Os autores sugerem que essa diferença é causada pela maior sensibilidade da PCR, pois 47% das amostras positivas apresentavam vírus não testados na IF. Somente 7 vírus podem ser identificados através da IF, enquanto 21 tipos diferentes podem ser detectados por PCR (JUNIOR et al, 2014).

RABONI e colaboradores, 2011, estudaram 171 amostras de pacientes hospitalizados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) entre maio e dezembro de 2009, utilizando o protocolo de qPCR para Influenza A pandêmico padronizado pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC). Um total de 67 amostras foram positivas para Influenza A pandêmico.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A disposição de testes moleculares no laboratório tem proporcionado uma maior eficiência e um aumento crescente na detecção de um amplo espectro de vírus respiratórios. No decorrer dos anos, os métodos de diagnóstico estão sendo aprimorados e com o avanço da tecnologia surgiram sistemas automatizados que permitem diminuir os erros operacionais e o tempo de execução.

Em relação às vantagens em utilizar um sistema de PCR multiplex em tempo real, ressalta-se que o tempo de liberação de resultado utilizando a metodologia de qPCR diminuiu significativamente, quando comparado à cultura de vírus e IF. Além disso, o manejo correto e precoce do paciente através de um diagnóstico rápido e preciso, diminuiu a possibilidade de contaminação hospitalar.

No que se refere à infecção respiratória viral, o diagnóstico rápido e preciso, contribuiu para o manejo correto do paciente e desse modo com a epidemiologia da doença. Compete ao laboratório e decisão de qual a melhor técnica de diagnóstico para a sua rotina a sua necessidade e ao introduzir técnicas de qPCR multiplex para essa função, o retorno tanto financeiro como para a saúde são esperados pois a especificidade e sensibilidade têm taxas elevadas.

REFERÊNCIAS

BABADY, NE. The FilmArray respiratory panel: an automate, broadly multiplexed molecular test for the rapid and accurate detection of respiratory pathogens. **Expert Rev Mol Diagn** v.48, p.779-788. 2013.

Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – **Ministério da Saúde**
Volume 48 N° 25 - ISSN 2358-9450 2017

BRASIL-Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Doenças Respiratórias. Caderno de Atenção Básica à Saúde, n 25 – Brasília. **Ministério da Saúde**, 2010

BRASIL. Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2016

BUDNIK I. FERRÉS O. M G, , PARDO T. ; EDWARDS J. T GONZALO LABARCA T., FELIPE REYES Z. CONSTANZA MARTINEZ-VALDEBENITO. LUISA MONTECINOS P Y CECILIA PERRET P. Aporte de la biología molecular en el diagnóstico de infecciones respiratorias agudas **Rev Chil Enferm Respir**, v.32,p.224-232. 2016

CDC. Estimates of Deaths Associated with Seasonal Influenza --- United States, 1976--2007 **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**. v.59(33);1057-1062 2010

DIAZ-DECARO J. D., GREEN, N. & GODWIN, H. Critical evaluation of FDA-approved respiratory multiplex assays for public health surveillance, **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.18, p.631-643. 2018.

DRYSDALE SB, KELLY DF. How to us...respiratory viral studies **Arch Dis Child Educ Pract. Ed**, v.0, p.1-5 2018

FREYMUTH F, 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.** v. 7, p1498–1504, 2006

FURLAN, T. M. **Estudo da viabilidade para introduzir na rotina testes de diagnóstico para infecção respiratória aguda**. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina da USP. 2016

HUANG, H.-S.; TSAI C.-L, CHANG J., HSU T.-C, LIN S; LEE C.-C, Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory vírus infection: systematic review and meta-analysis. , **Clin Microbiol Infect** v.xxx , p.1-9 , 2017

JÚNIOR, R. B. M., CARNEY, S.; GOLDEMBERG, D; BONINE, L; SPANO, L. C.;

SIQUEIRA, M.; CHECON, R. E. Detection of respiratory viruses by real-time polymerase chain reaction in outpatients with acute respiratory infection **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109(6), p.716-721, September 2014

KRAUSE, J. C. PANNING, M. HENGEL, H. HENNEKE ,P. The Role of Multiplex PCR in Respiratory Tract Infections in Children. **Dtsch Arztebl Int** , v.111 p. 639-645

LABORATÓRIO CENTRAL DO ESTADO. **NOTA TÉCNICA N° 02/2013** Ementa: Orientação para solicitação e envio de amostras para Pesquisa de Vírus Respiratórios por metodologia de Biologia Molecular no Lacen/PR PARANÁ (2013).

LOEFFELHOLZ, J.; PONG,D. L.; PYLES B.; XIONG, A; MILLER, L.; BUFTON, K. e T. CHONMAITREE. Comparison of the FilmArray Respiratory Panel and Prodesse Real-Time PCR Assays for Detection of Respiratory Pathogens. **J Clin Microbiol**, Dez.,v.49 p. 4083–4088, 2011

MAHONY, J. B. et al. Cost Analysis of Multiplex PCR Testing for Diagnosing Respiratory Virus Infections **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.2812-2817. 2009.

MARTINS C., et al., DNA quantification by real-time PCR in different forensic samples, **Forensic Sci. Int. Gene. Suppl.**v.5, p.545-546 2015.

MENGELLE, A.; MANSUYA,J. M1 PIERREA, A CLAUDETB,I. E. GROUATEAUB, P. MICHEAUB,K. SAUNÉA,C, J. IZOPETA,CA The use of a multiplex real-time PCR assay for diagnosing acute respiratory viral infections in children attending an emergency unit. **Journal of Clinical Virology** v.61, p.411-417 (2014).

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro. 2010

PAULIS; A. E. GILIO; A ARCHANJO FERRARO; A. E. FERRONATO; P OSSI DO SACRAMENTO; V FONGARO BOTOSSO; DANIELL BRUNA LEAL DE OLIVEIRA; JULIANA CRISTINA MARINHEIRO; CHARLOTTE MARIANNA HÁRSI; E. L. DURIGON; S. E. VIEIRA. Gravidade das coinfeções virais em lactentes hospitalizados com infecção por vírus sincicial respiratório. **J. PEDIATR.** V..87, n.4 p..307-313, 2011.

PIRALLA A. Film array respiratory panel performance in respiratory samples from neonatal care units. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**.v.79, p183-186 2014

PIERCE, V. M. & HODINKA, R. L. Comparison of the GenMark Diagnostics eSensor Respiratory Viral Panel to Real-Time PCR for Detection of Respiratory Viruses in Children. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, p. 3458–3465, 2012

RABONI, S.M.; STELLA, V.; CRUZ, C.; FRANÇA, J.; MOREIRA, S.; GONÇALVES, L.; NOGUEIRA, M.; VIDAL, L.; DEBUR, M.; CARRARO-JR, H. E SANTOS, C. D. Laboratory Diagnosis, Epidemiology, and Clinical Outcomes of Pandemic Influenza A and Community Respiratory Viral Infections in Southern Brazil., . **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p. 1287–1293 2011

RAND, K. H.; RAMPERSAUD, H. AND HOUCK H. J. Comparison of Two Multiplex Methods for Detection of Respiratory Viruses: FilmArray RP and xTAG RVP. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v.49 p. 2449–2453. 2011

RODRIGUES, J. C; L. V. FILHO, A. BUSH. Diagnóstico etiológico das pneumonias-uma visão crítica. **Jornal de Pediatria**. Rio de Janeiro, v.78, suppl.2, p.129-140. 2002