

EMERSON CARRARO

**APLICAÇÃO DE RECURSOS LABORATORIAIS
NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS
DE ETIOLOGIA VIRAL**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências

São Paulo
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EMERSON CARRARO

**APLICAÇÃO DE RECURSOS LABORATORIAIS
NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS
DE ETIOLOGIA VIRAL**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências

ORIENTADOR: NANCY CRISTINA JUNQUEIRA BELLEI

CO-ORIENTADOR: CELSO FRANSISCO HERNANDES GRANATO

Financiamentos: FAPESP (01/125796), CNPq e CAPES

São Paulo
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Carraro, Emerson

Aplicação de recursos laboratoriais no diagnóstico de infecções respiratórias de etiologia viral - Emerson Carraro

São Paulo, 2007.

VII, p.88

Laboratory resources applied for viral respiratory infections diagnostic

Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Infectologia - Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

1- Influenza; 2 – Adenovírus; 3 - Metapneumovírus humano

Como uma onda

Lulu Santos - Nelson Motta

Nada do que foi será
De novo do jeito que já foi um dia
Tudo passa
Tudo sempre passará
A vida vem em ondas
Como um mar
Num indo e vindo infinito

Tudo o que se vê não é
Igual ao que a gente viu há um segundo
Tudo muda o tempo todo no mundo
Não adianta fugir
Nem mentir pra si mesmo agora
Há tanta vida lá fora
Aqui dentro sempre
Como uma onda no mar!

ÍNDICE

Agradecimentos	I
Lista de abreviações	III
Lista de figuras	IV
Lista de tabelas	V
Resumo	VI
Summary	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Evolução das metodologias de diagnóstico laboratorial	4
1.2. Vírus Influenza	10
1.3. Adenovírus	12
1.4. Metapneumovírus humano	14
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	17
4. METODOLOGIA	18
4.1. População do estudo	18
4.2. Fluxograma dos testes realizados	19
4.3. Coleta e processamento das amostras	20
4.4. Pesquisa de antígenos por imunofluorescência	20
4.5. Cepas de vírus controle	23
4.6. Isolamento viral em cultura de células	23
4.7. Cultura rápida de vírus Influenza	25
4.8. Extração dos ácidos nucléicos	25
4.9. RT-PCR para detecção de Influenza A e B	26
4.10. PCR e nested-PCR para detecção de Adenovírus	28
4.11. RT-PCR para detecção de Metapneumovírus humano	30
4.12. Testes rápidos para detecção de Influenza	31
4.13. Análise estatística	32
5. RESULTADOS	33
5.1. Limite de detecção para os vírus Influenza A e B	33
5.2. Comparação entre cultura de células, RT-PCR e Imunofluorescência direta para identificação de Influenza A e B em amostras clínicas	35
5.3. Comparação de detecção de Adenovírus por IFD, PCR e Nested-PCR	39
5.4. Comparação de detecção de hMPV por RT-PCR e IFI	41
6. DISCUSSÃO	44
6.1. Influenza	45
6.2. Adenovírus	55
6.3. Metapneumovírus humano	57
7. CONCLUSÕES	61
8. BIBLIOGRAFIA	62
ANEXO 1	80
ANEXO 2	81
ANEXO 3	82

AGRADECIMENTOS

Difícil é expressar em palavras a gratidão por todos os que me acompanharam durante esses oito anos de convívio acadêmico e científico no laboratório de virologia clínica da disciplina de Infectologia da UNIFESP. Mas ficam aqui alguns registros de profundo reconhecimento pelos que me ajudaram, ou simplesmente me observaram e até para aqueles que, mesmo sem saber, dificultaram algumas coisas, pois toda a experiência é determinante no que nos tornamos...

Inicialmente agradeço a todos os diretores da pós-graduação que moldaram a disciplina de Infectologia ao estado de excelência que atualmente se encontra, em especial àqueles que o fizeram durante o período de minha participação: Dr Reinaldo Salomão, Dr Arnaldo Colombo e Dr Ricardo Diaz;

Em seguida, mas não menos especial, ao diretor do laboratório de virologia que um dia recebeu um jovem totalmente desconhecido para que este pudesse compartilhar de sua convivência e assim adquirisse os conhecimentos tão desejados à época. Ao professor doutor Celso Francisco Hernandez Granato, minha eterna admiração e gratidão!

Com certeza a pessoa responsável pela viabilização dos estudos aqui descritos, além de ser a maior incentivadora de tudo o que fiz nos últimos quatro ou cinco anos de minha vida profissional e acadêmica, foi aquela que se tornou minha orientadora, a Dra Nancy Cristina Junqueira Bellei. A esse exemplo de pessoa, profissional exigente e obstinação, jamais conseguirei expressar minha gratidão, restando, a mim, apenas o compromisso de tentar retribuir ao máximo por tudo!

Aos virologistas que contribuíram diretamente com o estabelecimento da linha de pesquisa em vírus respiratórios dentro do laboratório de Virologia e Imunologia da UNIFESP. Em especial à Ana Helena Sitta Perosa, que me acompanha desde à concepção dessa linha de trabalho até os dias de hoje

aplicando na “vida real” esses conhecimentos, também ao Daniel Ferreira de Lima Neto, pela sua importante contribuição no início dos estudos em hMPV no laboratório, e, mais recentemente, ao Aripuana Watanabe pela imensa contribuição na conclusão dos trabalhos e revisão de textos.

A todos os colegas dos laboratórios da Infectologia da UNIFESP pelo ótimo convívio e troca de experiências, desde 1999, não só no campo profissional mas também da vida. Do laboratório de Imunologia: Milena, Marta, Denise, Paulo, Décio, Otelo, Leandro e Sidnéia; do laboratório de Virologia: Anderson, Eliana, Maria, Graziela, Vivi, Aline, Giovana, Sandra e Shinai; do laboratório de retrovirologia: Charlys, Patrícia, Luciana, Lucia, Sandra, Erica, Dercy, Domingos, Cristiano, Carlos, Cecília, Mário e Wagner; dos laboratórios da Nefrologia: Cida, Marcos, Giovani e muitos outros que eu possa ter esquecido...

Aos colegas do Laboratório Clínico do Hospital Albert Einstein, em especial ao setor de Microbiologia: Dra Marines Martino e Dr Jacyr Pasternack, Itacy, Margareth, Daniela, Juliana, Fabiane, Débora, Fátima, Amilton, Tais, Thais, Alexandre, Igor, Roberta, Marcelo e Cristiane; os colegas do LATE: Dr João Renato, Rubia, Claudia, Roberta, Liana, Gregório e Daniel; e da informática Gilmar;

Aos demais amigos que me acompanham durante todos esses anos: Paulo, Marcos, Cilaine, Fávero, Aline, Najeh, Rubiana e Omar;

Por fim, àqueles por quem tenho amor incondicional, a mãe Eni e o irmãos Rodinei e Cristiane, e a minha companheira para todas as horas, a quem desejo todo o amor que houver nessa vida, Aline!

LISTA DE ABREVIações:

CDC – Center for Control of Diseases

cDNA – DNA complementar

DNA – Ácido desoxinucleotídico

dNTPs – Dinucleotídeo trifosfato

IFD – Imunofluorescência direta

IFI – Imunofluorescência indireta

MEM – Meio mínimo essencial (Minimal Essential Médium)

MDCK – Rim de cão Madin-Darbin (Madin Darbin Canine Kidney)

Nested-PCR – duas reações em cadeia da polimerase, uma seguida da outra

pb – pares de base

PBS – tampão fostado (Phosphated Buffer Saline)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

RNA – Ácido dexosirribonucleotídico

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (Reverse

Transcription Polymerase Chain Reaction)

Taq – *Termus aquaticus*

TCID₅₀ – Dose infecciosa que causa efeito citopático em 50% das células infectadas (50% Tissue Concentration of Infectious Dose)

Shell Vial – cultura de vírus pelo método acelerado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resultado da RT-PCR para detecção de vírus Influenza.....	36
Figura 2: Distribuição dos casos de Influenza detectados pelas diferentes técnicas com relação ao número de dias entre o início dos sintomas e a coleta da amostra.....	38
Figura 3: Visualização do gel com os resultados dos ensaios moleculares para Adenovírus.....	40
Figura 4: Distribuição de casos de infecção por Adenovírus detectados pela nested-PCR em relação ao número de dias após o início dos sintomas até a coleta da amostra.....	41
Figura 5: Detecção de hMPV por IFI e RT-PCR.....	42
Figura 6: Distribuição das amostras positivas em cada teste para hMPV de acordo com o tempo de início dos sintomas no momento da coleta.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites de detecção comparativos entre os diferentes testes aplicados na detecção de três cepas controles de vírus Influenza.....	34
Tabela 2: Comparação da detecção de Influenza A e B em 404 amostras através de isolamento em cultura de células, IFD e RT-PCR.....	37
Tabela 3: Comparação entre IFI e RT-PCR para a detecção de hMPV em 174 amostras clínicas.....	43

RESUMO

Grandes avanços no desenvolvimento de metodologias laboratoriais para a investigação de vírus respiratórios têm ocorrido nos últimos anos. No primeiro experimento, mostramos que as técnicas de RT-PCR, “shell vial” e isolamento viral em cultura de células obtiveram limites de detecção de Influenza A e B comparáveis, mas todos os testes rápidos comerciais avaliados tiveram baixo desempenho. Em segundo experimento, foram comparadas diferentes técnicas para a detecção de vírus respiratórios em 412 amostras de lavado nasal coletados de adultos com infecção respiratória aguda (2001-2003). As técnicas de RT-PCR e imunofluorescência direta (IFD) foram comparadas com o isolamento de Influenza A e B em cultura de células. A concordância geral entre os três ensaios foi de 96%, sendo a sensibilidade obtida para a RT-PCR de 92,3% e a especificidade de 98,5% e para a IFD os valores de 93,6% e 97,2%, respectivamente. Para a detecção de Adenovírus foram comparados os testes de PCR, nested-PCR e IFD, sendo obtida positividade (4,1%) somente na nested-PCR. Amostras negativas nos ensaios anteriores foram submetidas à detecção de Metapneumovírus humano por imunofluorescência indireta (IFI) em comparação com a RT-PCR e demonstrou sensibilidade de 45%. Os ensaios de IFD e RT-PCR demonstraram boa aplicação na rotina diagnóstica de Influenza, mas os testes rápidos devem ser aplicados com cautela. Para a detecção de Adenovírus e Metapneumovírus humano os ensaios de imunofluorescência obtiveram baixos desempenhos, devendo ser aplicado as metodologias moleculares para esse vírus.

SUMMARY

Laboratory tests performance for respiratory viruses has shown substantial increase in the past years. A first step experiment for comparison of influenza virus limit of detection resulted in similar values for RT-PCR, shell vial and cell cultures methods, but worse values for all commercial rapid antigen detections kits evaluated with same control strains. In a second step, 412 nasal washes from adults presenting with acute respiratory symptoms (2001-2003) were submitted to comparative studies for respiratory viruses detection. A duplex RT-PCR and direct immunofluorescence (DFA) assays were compared to Influenza A and B virus isolation (reference method) in MDCK cells. The overall concordance between the three assays was 96%. RT-PCR reached 92.3% sensitivity and 98.5% specificity and for DFA the corresponding values were 93.6% and 97.2%, respectively. A PCR, nested-PCR, and DFA assays were evaluated for detection of Adenovirus and positivity (4.1%) were only obtained on Nested-PCR. Selected negative samples were evaluated for human Metapneumovirus by indirect fluorescence assay (IFA) in comparison with RT-PCR and sensitivity was 45%. DFA and RT-PCR could be applied in different routine sets for influenza diagnosis and rapid antigen detection kits may be used with caution. For Adenovirus and Metapneumovirus fluorescence assays detection were disappointed and molecular tests are recommended for these viruses.

1. INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias de etiologia viral consistem na doença mais comum que acomete a espécie humana, sendo estimado que cada pessoa adulta pode apresentar um a três episódios de infecção respiratória aguda a cada ano (Anderson et al, 1983). As doenças respiratórias agudas são causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo, resultando em importante gasto de recursos destinados à área de saúde nacional (Bertino, 2002). Estima-se que nos Estados Unidos da América (EUA) ocorram mais de 200 milhões de episódios, resultando em mais de 5 milhões de pneumonias em pessoas de todas as idades. As estimativas apontam para conseqüências ainda maiores, com aproximadamente 100 milhões de dias de trabalho perdidos por adultos infectados e mais de 90 milhões de dias em absenteísmo escolar de crianças devido a essa doença (Kaiser et al, 1999a).

A apresentação clínica dos pacientes infectados é bastante variável, sendo na maioria das vezes caracterizada por quadro agudo e autolimitada. Contudo, as infecções respiratórias agudas virais podem complicar ou mesmo predispor à infecção bacteriana secundária, resultando no óbito do paciente em 20 a 30% dos casos (Monto, 1995). Outras complicações da infecção no trato respiratório causada por vírus incluem a otite aguda média, sinusites, além da infecção no trato respiratório inferior e exacerbação de quadros pré-existentes como asma e doenças pulmonares crônicas (Munoz et al, 2000).

A possibilidade etiológica dos vírus que infectam o trato respiratório de forma esporádica ou epidêmica inclui mais de 200 vírus antigenicamente distintos, tanto em crianças quanto em adultos. A investigação etiológica de infecções respiratórias agudas de origem viral deve ser direcionada, no entanto, para o grupo dos vírus mais freqüentemente encontrados, que geralmente inclui as famílias Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae, Picornaviridae, Adenoviridae e Coronaviridae (Mackie, 2003). Como a maioria dessas infecções é de difícil diferenciação apenas pela apresentação clínica dos pacientes, a investigação laboratorial é essencial para seu diagnóstico. A confirmação da etiologia permite o controle adequado da infecção, incluindo o início da terapia antiviral, quando possível, medidas de suporte para os pacientes com maior risco de complicações ou até medidas de controle de infecção para os hospitalizados (Greenberg, 2002).

O vírus Influenza é o principal responsável pelo aumento das taxas de hospitalização e morte durante o inverno, todos os anos. Juntamente com o Vírus Sincicial Respiratório (VSR) são os grandes responsáveis pelas hospitalizações devido à complicação de quadros respiratórios, sendo o vírus Influenza de maior prevalência em adultos e idosos e o VSR em crianças (Jansen et al, 2007). As populações com maior risco de complicação decorrente da infecção pelo vírus influenza incluem adultos portadores de doenças cardíacas, pulmonares e metabólicas, crianças menores, idosos e imunocomprometidos (Fiore et al, 2007). Estimativas recentes de dados norte-americanos apontam para um impacto direto do vírus influenza como o responsável por cerca de 31 milhões de atendimentos em serviços de saúde e

3 milhões de dias de hospitalização dos casos com complicações, a cada ano. Toda essa demanda de serviços e recursos da área de saúde resultam em custos diretos e indiretos estimados em mais de 80 bilhões de dólares americanos (Molinari et al, 2007).

No Brasil, as complicações decorrentes da infecção por Influenza foram responsáveis por cerca de 140.000 internações hospitalares ao ano na faixa etária de 60 anos ou mais, durante o período 1995 a 2001, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. No Estado de São Paulo, cerca de 27.700 internações ao ano ocorreram no período 1998-2003, na mesma faixa etária, de acordo com os dados do Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2004).

Outros vírus respiratórios também apresentam importante papel na etiologia das infecções respiratórias agudas, principalmente em pacientes em estado de supressão imunológica, como os regimes à que são submetidos os pacientes após transplantes de órgãos ou medula óssea. Nessa população ganham importância vírus menos frequentes na população imunocompetente e, freqüentemente, estas viroses são associados à doença grave em imunocomprometidos, como o Parainfluenza e o Adenovírus (Lee et al, 2007). A grande variedade de agentes virais envolvidos na etiologia das infecções respiratórias agudas, associado à ampla diversidade de apresentações clínicas desses quadros dificulta o diagnóstico diferencial (Jain et al, 2001; Wei et al, 2001; Bisno, 2001; Heikkinen et al, 2000). Provavelmente, a apresentação

clínica de pessoas infectadas pelos diferentes vírus respiratórios é indistinguível e faz dos testes laboratoriais uma ferramenta essencial nesse aspecto (Ison et al, 2002).

Apesar do grande impacto causado pelos vírus respiratórios e o progresso das pesquisas envolvendo novas opções de intervenções na sua história natural, ainda há poucas alternativas terapêuticas ou profiláticas e, quando disponíveis, somente para alguns poucos agentes (Schmidt et al, 2001). Dentre estas se incluem o tratamento com antiviral específico e a prevenção contra o vírus influenza (Hayden, 2006; Salgado et al, 2002) e o VSR (Falsey, 2007).

1.1 Evolução das metodologias de diagnóstico laboratorial:

O isolamento de vírus teve origem nos experimentos que visavam à recuperação de vírus, como Vaccinia e Variola, para produção de vacinas no início do século passado (Stinehardt et al, 1913; Rivers et al, 1935). No entanto, até a década de 50 não havia interesse nessa metodologia como diagnóstico de infecções virais. Foi em 1949 quando Enders e colaboradores descreveram a capacidade de recuperação de Poliovírus em células não neuronais que se despertou tal interesse.

Na metade do século passado, os métodos de isolamento viral avançaram muito, em grande parte pelo desenvolvimento de meios de culturas comerciais, com composição química definida e à adição de antibióticos nesses

meios. No entanto, o método de isolamento viral em cultura de células depende da visualização da proliferação viral ao microscópio, fato que freqüentemente exige longos períodos de incubação, resultando em menor utilidade para o diagnóstico em virologia clínica. A evidência de proliferação viral é conhecida como efeito citopático, que consiste basicamente de alterações morfológicas nas células que podem ser sugestivas do vírus que está sendo isolado. Contudo, mesmo observadores experientes necessitam de testes confirmatórios para uma identificação viral definitiva. Além do efeito citopático, vários testes embasados nas características diferenciais entre os vírus foram aplicados ao longo dos anos, como a hemadsorção e resistência a pH ácidos. O grande avanço na confirmação de isolados virais em cultura de células ocorreu com o uso de soros neutralizantes contendo anticorpos com especificidade conhecida, impedindo as novas partículas virais geradas de infectar novas células (Leland et al, 2007).

A necessidade de resultados mais rápidos do que a cultura viral clássica poderia oferecer, associada à possibilidade da confirmação do resultado da cultura através de anticorpos específicos contra o vírus investigado, possibilitou importante variação metodológica no isolamento viral. A combinação da sensibilidade do isolamento viral em cultura de células com a velocidade de detecção de antígenos virais possibilitaram o desenvolvimento de uma cultura viral acelerada. Esse método foi inicialmente aplicado no diagnóstico do Citomegalovírus, através da detecção de antígenos virais no núcleo de células diplóide fibroblásticas (Gleaves et al, 1984). Consistia, basicamente, da inoculação da amostra do paciente por centrifugação na cultura de células em

baixa velocidade durante cerca de 1 hora e, após incubação de aproximadamente 16 horas, a revelação com anticorpos monoclonais específicos marcados com fluorocromos ou peroxidase. O nome dado a este procedimento de identificação viral independente de aparecimento do efeito citopático foi “shell vial” se realizado em tubos e, “cluster plate”, se realizado em placas próprias para cultura de células (Halonen et al, 1996). Nos anos seguintes, várias outras aplicações foram dadas para esse sistema de cultura acelerada, como a detecção do vírus Herpes Simples (Gleaves et al, 1985), Vírus Sincicial Respiratório e vírus Influenza (Waris et al, 1990; Ziegler et al, 1995).

O primeiro experimento utilizando um anticorpo para a detecção de vírus diretamente em amostra de aspirado nasofaríngeo de paciente com doença respiratória aguda foi realizado em 1968. Na ocasião, McQuillin e Gardner (1968) obtiveram um bom resultado empregando um anti-soro obtido de coelho infectado com VSR e um conjugado que reagia contra anticorpo de coelho.

Conforme a tecnologia de produção de anticorpos monoclonais evoluiu, as fluorescências inespecíficas foram reduzidas e foi possível a observação de fluorescência específica com maior intensidade de brilho e a técnica pode ser empregada em vários laboratórios de pesquisa (Kim et al, 1983). Em seguida, os reagentes tiveram sua produção aprimorada e tornou-se possível à obtenção em grandes quantidades, o que permitiu a comercialização a preços viáveis, garantindo sua disseminação entre laboratórios de rotina de virologia clínica (Hierholzer, 1991). Assim, os procedimentos foram se adequando à

rotina dos laboratórios de virologia e os fatores que aprimoraram a utilização dessa técnica foram sendo descritos. O primeiro fator determinante da qualidade do resultado obtido na imunofluorescência é a recuperação de células esfoliativas do trato respiratório, por isso, estabeleceu-se a importância da coleta das amostras ser realizada por pessoal especificamente treinado. Após a coleta, as lavagens repetidas do material para a retirada de muco e outros materiais determinantes de coloração inespecífica são importantes, bem como a leitura da reação realizada por microscopista experiente (Halonen et al, 1996).

O aperfeiçoamento da metodologia foi obtido com a comercialização de anticorpo monoclonal já conjugado à molécula fluorescente. O método foi, então, descrito como imunofluorescência direta (IFD), distinto daquele utilizando um anticorpo secundário chamado de imunofluorescência indireta (IFI) (Madeley et al, 2002). Iniciava-se pela primeira vez na história da virologia clínica a oferta de um teste diagnóstico confirmatório rápido, com resultado obtido em escala de tempo que permitia a alteração de conduta clínica (em menos de 24 horas), possibilitando uma resposta rápida aos questionamentos do médico. O diagnóstico rápido das infecções respiratórias virais passou a ter uma relação custo-benefício favorável, reduzindo o tempo de hospitalização e uso de antibióticos, tanto em crianças quanto adultos (Woo et al, 1997; Barenfanger et al, 2000).

Nos anos seguintes, a evolução na detecção viral pela técnica de imunofluorescência foi alcançada através da combinação de vários anticorpos

específicos para diferentes vírus num único reagente (“pool”) para a triagem de casos positivos, com posterior confirmação do agente etiológico numa segunda reação de coloração (Stout et al, 1989). Alguns anos depois, essa vantagem de detecção de múltiplos patógenos no mesmo ensaio foi modificada introduzindo-se marcações com fluorescências (fluorocromos) de cores diferentes em anticorpos dirigidos contra vírus diferentes. Desse modo, com esse “pool” de anticorpos é possível diferenciar os vírus na leitura da primeira etapa da reação, reduzindo consideravelmente os custos e o tempo da investigação etiológica dos principais vírus respiratórios (Landry et al, 2000).

Praticamente ao mesmo tempo, outra metodologia começou a ser desenvolvida em laboratório, a partir da amplificação enzimática de ácidos nucléicos *in vitro* descrita por Saiki e colaboradores (1985) e denominada de PCR (Polymerase Chain Reaction). Já nos primeiros experimentos aplicados à detecção de vírus diretamente em amostras clínicas, essa nova metodologia de detecção de genoma viral mostrou elevada sensibilidade, pois permite a detecção do vírus mesmo com pequenas quantidades de antígenos e não necessita de partículas viáveis (Ou et al, 1988). Em poucos anos, esses métodos demonstraram-se muito específicos, rápidos e flexíveis para serem aplicados na detecção de diferentes vírus DNA e RNA, diretamente em amostras clínicas (Clementi et al, 1993).

Com o passar de duas décadas de desenvolvimento das técnicas moleculares nos laboratórios de virologia, muitos avanços foram obtidos. O protocolo inicial de amplificação específica de ácidos nucléicos e sua

visualização após eletroforese em gel (Mullis et al, 1987) evoluíram rapidamente para sistemas de detecção do material amplificado por reações colorimétricas, como ELISA (“Enzyme-Linked Immuno Assay”) (Keller et al, 1990), por “Southern blotting” (Holland, 1991) e por marcações com moléculas fluorogênicas (Lee et al, 1993). Apesar do aumento na complexidade e no tempo para a obtenção do resultado, a partir da inclusão de passos para a detecção do produto amplificado, os ensaios de PCR tornaram-se mais reprodutíveis, reduzindo as variações intra- e interlaboratoriais. No entanto, a transferência dessa metodologia dos laboratórios de pesquisas para os laboratórios de rotina em virologia clínica somente se tornou uma realidade após a automação dessas técnicas (Klapper et al, 1998). Apesar dos recentes avanços na rotina laboratorial de investigação viral pelos métodos moleculares, estes ainda são dependentes de equipamentos, recursos humanos e reagentes de custos elevados o que limita a utilização em poucos laboratórios.

Apesar do avanço e da diversidade de técnicas e equipamentos disponíveis no campo da detecção molecular, ainda são escassos os kits comerciais para a pesquisa dos vírus respiratórios. A comercialização de reagentes padronizados é ponto fundamental para que essas técnicas sejam difundidas nos laboratórios de virologia. Muitos são os protocolos desenvolvidos em laboratórios de pesquisa para a detecção dos vírus respiratórios e são variáveis os resultados obtidos por eles. O desempenho dos testes moleculares varia significativamente conforme as variações metodológicas possíveis: métodos de extração de ácidos nucleicos, genes virais utilizados como alvo da detecção e variações na tecnologia de

amplificação e sua detecção. Também influenciam no desempenho dos testes as condições encontradas em cada rotina laboratorial, como a coleta da amostra, o tipo de material coletado, as condições de transporte e armazenamento desse material, além da própria variação da cepa viral que pode ocorrer a cada ano (Weinberg et al, 2005). Assim o desempenho dos diversos ensaios comentados anteriormente para o diagnóstico de infecções respiratórias virais é bastante variável, o que torna complexa a escolha do ensaio mais adequado a ser utilizado em cada serviço.

1.2 Vírus Influenza:

A suspeita clínica da infecção pelo vírus Influenza somente é confirmada através do diagnóstico laboratorial. O isolamento viral em cultura de células é considerado o padrão-ouro na área de virologia e, especialmente para o vírus Influenza, permite a recuperação de cepas virais para posterior análise genética e antigênica. A análise antigênica de isolados é realizada em cepas virais encaminhadas de todo o mundo e consiste na vigilância mundial de Influenza. A partir desses dados obtidos a Organização Mundial de Saúde (OMS) determina a composição de cepas que compõem a vacina contra o vírus Influenza de cada ano (Stephenson et al, 2002). Deste modo, a cultura de vírus Influenza permanece como a metodologia essencial nos laboratórios regionais de vigilância. No entanto, esta metodologia não fornece informações úteis para os laboratórios que necessitam de resultado em menos de 48 horas para

indicar o início da terapia antiviral ou medidas de controle de infecção (Belshe, 1999; Hayden, 2006).

Como alternativa, os laboratórios de virologia clínica têm aplicado a cultura rápida de vírus Influenza pelo método de “Shell vial” que obtém resultado em 24-72 horas. Esta metodologia tem sido proposta, inclusive, como uma alternativa para recuperar vírus isolado para futura caracterização antigênica, uma vez que o sobrenadante dessa cultura pode ser estocado e usado para reinoculação em cultura celular clássica (Stamboulian et al, 2000).

Dentre as novas metodologias descritas como testes de diagnóstico rápido é possível a detecção de ácidos nucléicos ou proteínas virais. Os diversos testes para detecção de RNA de Influenza comumente mostram resultados comparáveis (Rebelo-de-Andrade et al, 2000). São testes desenvolvidos em laboratórios de pesquisa e têm seu desempenho muito relacionado à escolha do gene viral alvo para amplificação pela PCR. Já os testes de detecção de proteína viral podem ser realizados várias plataformas diferentes: detecção de proteínas intracelulares de células recuperadas do próprio paciente e reveladas por imunofluorescência (IF); ou o reconhecimento das proteínas virais em membranas de diferentes composições, mas que indicam a visualização do resultado em poucos minutos após uma reação enzimática (enzimaimunoensaio) ou pelo acúmulo de partículas coloridas (imunocromatográfico). Estes últimos foram desenvolvidos para fornecer um resultado no momento do atendimento do paciente (resultado em menos de 1 hora), são os classicamente chamados de testes rápidos (Gavin et al, 2003).

De modo geral, a capacidade desses testes é menor, mas a perda em sensibilidade pode ser compensada pela rapidez no acesso ao resultado (Cox et al, 1999).

Recentemente, vivenciamos uma situação de risco de pandemia causada por Influenza, devido à transmissão de casos esporádicos de vírus Influenza aviário, do subtipo H5N1, para a espécie humana. Diante de um cenário destes, onde há grande número de amostras suspeitas recebidas pelo laboratório de virologia para a investigação de influenza, a cultura viral pode não ser a melhor escolha, pois há necessidade de máxima rapidez na obtenção dos resultados. Nesse sentido, outras metodologias têm de ser desenvolvidas e, em situação de pandemia estabelecida onde recursos da área de saúde como testes laboratoriais podem ser escassos, somente testes que podem ser desenvolvidos em cada laboratório estarão disponíveis (Petrick et al, 2006).

1.3 Adenovírus:

O diagnóstico do Adenovírus é essencialmente laboratorial, uma vez que se trata de um vírus de ampla variabilidade, com cerca de 51 sorotipos distintos, e relacionados a amplo espectro de sintomas clínicos (Hierholzer, 1992). Nos últimos anos, tem se documentado uma importância cada vez maior deste agente como responsável por infecções graves em diferentes populações de imunocomprometidos (Blanke et al, 1995; Carrigan, 1997; Flomenberg et al, 1994; Howard et al, 1999; Kojaoghlanian et al, 2003; Walls et al, 2003).

Assim como no caso do vírus Influenza, a cultura clássica para Adenovírus tem seu uso cada vez mais restrito a poucos laboratórios devido à inviabilidade no manejo clínico dos pacientes a partir deste resultado. Uma das grandes dificuldades no diagnóstico das infecções causadas pelo Adenovírus é a grande diversidade entre os genes e proteínas que diferenciam os sorotipos do vírus, sendo descritos pelo menos 51 diferentes sorotipos (Wood et al, 1997). Dessa forma, assim como o anticorpo dirigido contra a proteína viral deve permitir a detecção de todos os sorotipos de adenovírus, o gene alvo da amplificação pelos métodos moleculares idealmente deve ter o mesmo consenso. No entanto, observamos que a detecção dos sorotipos de Adenovírus causadores de doenças gastroentéricas está mais avançada que nas demais situações (Goodgame, 1999).

Provavelmente o Adenovírus pode estar sendo subdetectado como agente etiológico de infecções respiratórias. Há um menor rendimento na detecção desse vírus através da técnica de IFD amplamente empregada na maioria dos laboratórios de virologia (Landry et al, 2000). Assim como a metodologia de isolamento em cultura de células demonstra baixos índices de recuperação viral quando comparado aos métodos moleculares (Hierholzer, 1992). Outra situação que pode contribuir para isso é o fato de ser descrito, muitas vezes, como vírus importante somente na população de crianças, sendo negligenciado como agente etiológico de infecções nas demais populações (Yang et al, 1995).

1.4 Metapneumovírus:

O Metapneumovírus humano (hMPV), inicialmente descrito em 2001 por Van den Hoogen e colaboradores, tem sido implicado como agente causador de doenças respiratórias em pessoas de todas as idades e em todas as partes do mundo (Fouchier et al, 2005). A detecção desse agente pela metodologia de cultura de células tem se mostrado pouco prático na rotina laboratorial, uma vez que exige linhagem de células diferente das usualmente aplicadas na rotina de virologia clínica, além de sensibilidade muito menor em relação às metodologias moleculares e a própria demora na obtenção do resultado (Boivin et al, 2002).

Apesar da ausência de terapia antiviral ou profilaxia específica, a inclusão da detecção do hMPV tem se mostrado essencial na rotina diagnóstica das infecções virais respiratórias, pois seguidamente resulta em infecções graves, com hospitalização e morte, principalmente em crianças jovens e imunocomprometidos (van den Hoogen et al, 2004). Até pouco tempo atrás, os testes moleculares eram os únicos amplamente utilizados para a detecção de hMPV, tornando a rotina de diagnóstico desse vírus limitada. Novas metodologias, a partir do desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos, têm sido aplicadas na detecção de hMPV e podem, no futuro, tornar-se parte da rotina nos laboratórios de virologia. (Burik, 2006).

2. JUSTIFICATIVA:

Diante da diversidade de possibilidades de testes para a detecção de vírus respiratórios, o laboratório deve considerar não somente o desempenho dos testes, mas também os demais fatores associados à sua aplicação, como o custo e o tempo de obtenção do resultado.

O isolamento viral foi o grande propulsor da virologia clínica no passado, mas vem sendo substituído nos laboratórios por metodologias que não dependem da detecção de vírus viáveis na amostra, fator esse que contribui para o menor desempenho desta técnica em comparação com as novas metodologias. Além disso, a necessidade de pessoal altamente treinado para a realização de técnicas não automatizadas, dependentes de tempo, tem contribuído para o abandono da cultura de vírus. Avanços em novas tecnologias foram obtidos, mas com acréscimo no custo de reagentes e equipamentos, portanto, determinam uma relação custo-benefício desfavorável na aplicação de todos os recursos disponíveis para o diagnóstico de infecções respiratórias virais (Leland et al, 2007).

Visando essencialmente a aplicação de testes laboratoriais para o diagnóstico rápido da etiologia viral em secreções respiratórias houve um predomínio de técnicas como a imunofluorescência na maioria dos laboratórios de virologia. No Brasil, a vigilância laboratorial dessas infecções foi sistematicamente implementada e é praticamente realizada somente nos Laboratórios Centrais dos vários estados (LACEN), onde a técnica de imunofluorescência foi escolhida (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2004).

A atual situação da rotina laboratorial no diagnóstico das infecções respiratórias virais ainda persiste distante de todo o aparato de recursos que os laboratórios de pesquisa vêm desenvolvendo. As futuras decisões sobre a absorção da constante evolução metodológica devem ser subsidiadas por avaliações sistemáticas, em que o desempenho relativo das diversas técnicas seja contextualizado em cada realidade do serviço de saúde e população atendida.

3. OBJETIVO GERAL:

Avaliar diferentes testes diagnósticos para a detecção dos vírus Influenza A e B, Adenovírus e Metapneumovírus em amostras de pacientes adultos com infecção respiratória aguda.

3.1. Objetivos específicos:

Comparar testes de diferentes metodologias quanto ao limite de detecção de cepas controles de vírus Influenza A e B;

Avaliar o desempenho dos métodos de imunofluorescência, a amplificação do genoma viral e o isolamento em cultura de células para o diagnóstico de infecção por vírus Influenza em amostras clínicas;

Avaliar o desempenho dos métodos imunofluorescência e amplificação do genoma de Adenovírus e Metapneumovírus humano em amostras clínicas;

4. METODOLOGIA:

4.1. População do estudo:

As amostras utilizadas no presente estudo foram coletadas previamente para um estudo clínico e epidemiológico com o objetivo de investigar a etiologia de infecções virais respiratórias agudas em diferentes populações de risco da cidade de São Paulo (Bellei et al, 2007a). O estudo inicial incluiu 412 adultos durante os anos de 2001 a 2003 que apresentaram suspeita de infecção respiratória aguda e foram atendidos em diferentes locais de serviço de assistência à saúde do Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo (HSP – UNIFESP). Todos os pacientes foram convidados a participar da pesquisa e, após o devido esclarecimento, assinaram o consentimento informado autorizando a coleta da amostra.

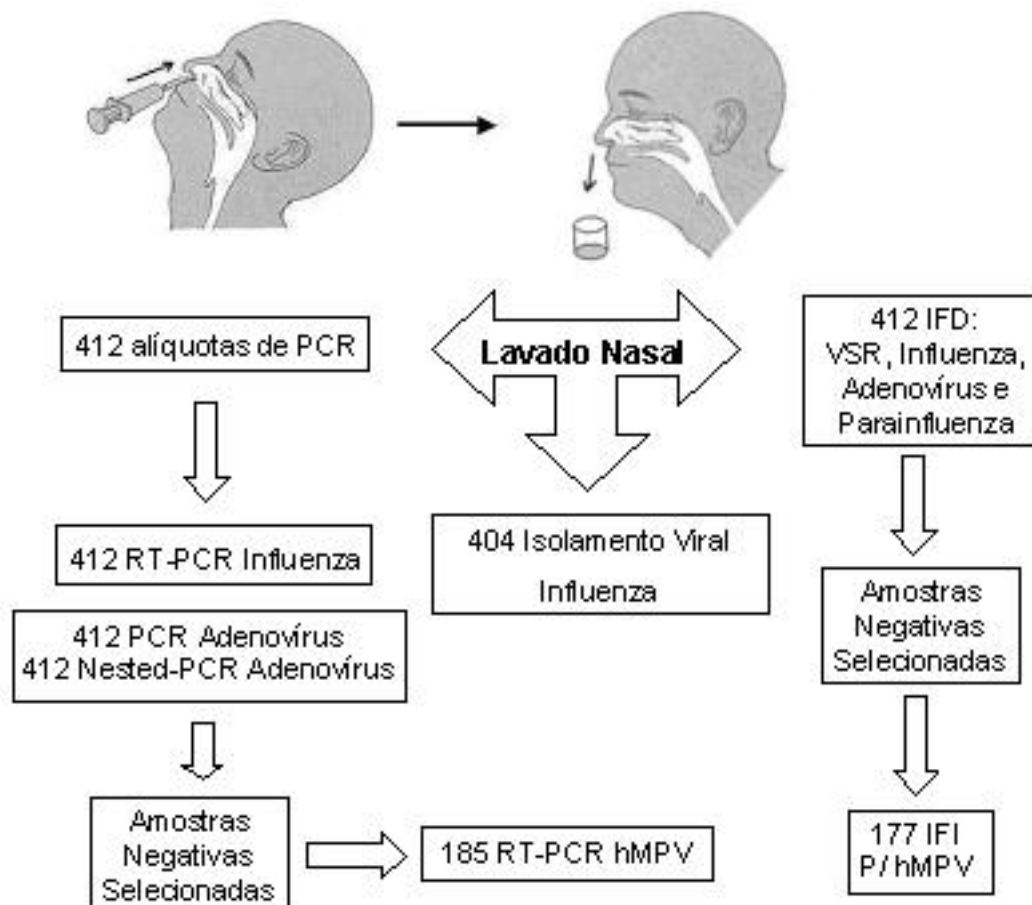
As amostras foram coletadas de: 204 (49,5%) profissionais de saúde (Núcleo de Assistência à Saúde do Funcionário da UNIFESP), 139 (33,7%) pacientes representantes da população geral (Pronto Socorro do Hospital São Paulo) e 69 (16,8%) transplantados renais (Ambulatório de Transplantados Renais do Hospital de Rim e Hipertensão). Dados clínicos e epidemiológicos foram coletados através de questionário específico (anexo 1). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP após a autorização da utilização das amostras pelo autor do estudo original (anexo 2).

4.2. Fluxograma dos testes realizados:

Primeira etapa - cepas controles avaliadas pelos respectivos métodos:

- Influenza A/NewCaledonia/20/99 (H1N1), Influenza A/Panama/2007/99 (H3N2) e Influenza B/HongKong/33/01: cultura clássica, Shell Vial, IFD, RT-PCR e testes rápidos;
- Adenovírus sorotipo 3: cultura clássica, IFD, PCR e Nested-PCR;
- Metapneumovírus humano: cultura clássica, IFI e RT-PCR;

Segunda etapa - Amostras clínicas investigadas:



4.3. Coleta e processamento das amostras:

Para cada paciente foi obtida uma amostra de lavado nasal, instilando-se 5mL de Ringer-lactato (Aster Farmacêutica, Brasil) em cada narina e posterior recuperação do lavado em recipiente coletor estéril. Após a coleta e transporte do material em gelo até o laboratório, foram separadas as alíquotas para a realização dos diferentes testes, conforme demonstrado no item 4.2 da metodologia. Para cada amostra, duas alíquotas de 500 μ L (1mL) foram separadas e estocadas em freezer -70°C para a realização dos ensaios moleculares e outra alíquota de 500 μ L do lavado foi adicionada à igual volume de meio de transporte de vírus (Cultilab, Brasil) e estocada em freezer -70°C para a realização do isolamento viral.

O volume restante do material coletado foi usado na preparação das lâminas para os ensaios de imunofluorescência. Nas amostras com volume inferior a 4mL optou-se pela não separação da alíquota para cultura, reservando volume mínimo de 2mL para a preparação das lâminas.

4.4. Pesquisa de antígenos por imunofluorescência (IF):

As amostras de lavado nasal foram centrifugadas a 500g por 5 minutos para separação das células. Se a amostra continha muco visível foi adicionado Acetilcisteína 2% (Sigma, EUA), homogeneizando bem e deixando em repouso durante 5 minutos, antes da centrifugação. O sedimento de células foi lavado pela adição de 10mL de PBS pH 7.4 (“Phosphate-buffered Saline”), fornecido pelo kit, e centrifugado novamente nas condições descritas anteriormente. Em

seguida, 30 μ L do sedimento contendo as células resultantes da centrifugação foram transferidos para uma lâmina e, após seca, foi fixado com acetona PA (Merck, Alemanha) por 10 minutos. Foram confeccionadas duas lâminas contendo um botão de células e duas lâminas contendo três botões de células cada, sendo que as lâminas não utilizadas logo após sua preparação foram congeladas a -70°C envolvidas em papel alumínio.

Para o estudo anterior foram investigadas as etiologias de Vírus Sincicial Respiratório (VSR), Influenza A e B, Adenovírus e Parainfluenza 1, 2 e 3. Para isso, logo após a fixação das lâminas, uma delas contendo um botão de células foi selecionada para a revelação por imunofluorescência. Foram adicionados 40 μ L do reagente “SimulFluor Respiratory Screen” (Chemicon International Inc., EUA) sobre o botão de células já fixadas na lâmina. Após a incubação em câmara úmida a 37°C, durante 30 minutos, a lâmina foi lavada com PBS por 5 minutos, seca à temperatura ambiente e protegida de luz, sendo a seguir coberta com glicerol tamponado e lamínula.

A leitura foi realizada em microscópio de epifluorescência (Nikon, EUA) com aumento de 400X, em sala escura. A visualização de células íntegras com inclusões amarelo-ouro fluorescentes indicou a presença de VSR. A presença de células com inclusões verde-maçã fluorescentes indicou a presença de um dos outros vírus respiratórios (Influenza A e B, Adenovírus e Parainfluenza tipos 1, 2 e 3). Para todas as lâminas com essa positividade foi realizada a coloração de duas outras lâminas preparadas previamente com as células do mesmo paciente em 6 botões separados. Cada botão de células foi corado com

um reagente específico para cada um dos vírus: Influenza A e B, Adenovírus, Parainfluenza 1, 2, e 3 (Chemicon International Inc., EUA). Da mesma forma que a lâmina anterior, esta foi incubada a 37°C durante 30 minutos, lavada com PBS e seca à temperatura ambiente e protegida de luz. A seguir, o botão de células coradas foi coberto com glicerol tamponado e lamínula para observação ao microscópio quanto à presença de células com inclusões verde-maçã fluorescentes, indicando a positividade para o respectivo vírus. A presença de pelo menos uma célula íntegra com inclusões verde-maçã fluorescentes características indicou positividade. Amostras negativas contendo menos de 20 células íntegras foram consideradas inadequadas (Landry et al, 2000).

Posteriormente, a outra lâmina contendo um botão de células, preparada previamente e estocada à -70°C, foi submetida à detecção de antígenos de hMPV através da revelação por imunofluorescência indireta (IFI). Após descongelamento, as lâminas foram fixadas novamente em acetona PA (Merck, Alemanha) por 10 minutos e incubadas com 40µL de anticorpo monoclonal MAb-8 diluído 1/50 (gentilmente cedido pelo CDC, EUA) durante 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Após lavagem com PBS, foram adicionados 40µL de anticorpo policlonal anti-mouse marcado com FITC diluído 1/50 (Dako Cytomation, Dinamarca) e incubado por 45 minutos a 37°C em câmara úmida escura. Após nova lavagem com PBS, as lâminas foram secas e montadas com glicerina tamponada e lamínula para observação em microscópio de epifluorescência (Nikon, EUA). A presença de pelo menos uma célula íntegra com inclusões verde-maçã características indicou positividade da amostra para o hMPV.

4.5. Cepas de vírus controles:

A padronização e a otimização dos ensaios moleculares foram realizadas utilizando-se como parâmetro o limite de detecção das cepas controles virais determinado por isolamento em cultura de células. Foi estabelecida a sensibilidade comparativa pela diluição seriada desses controles em 10 vezes de meio de transporte de vírus (Cultilab, Brasil) até a diluição de 10^{-10} , que foram testadas em paralelo pelas técnicas descritas conforme mencionado no item 4.2 da metodologia como a primeira etapa do estudo. Os controles incluem: três subtipos de vírus Influenza representantes das cepas de circulação recente (Influenza A/NewCaledonia/20/99 H1N1, Influenza A/Panama/2007/99 H3N2 e Influenza B/HongKong/33/01), gentilmente cedidas pelo Laboratório Fleury, Adenovírus sorotipo 3, gentilmente cedido pelo laboratório clínico do Hospital Albert Einstein, e Metapneumovírus humano, gentilmente cedido pelo Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

4.6. Isolamento viral em cultura de células (método clássico):

Diferentes linhagens de células foram utilizadas para o crescimento dos diferentes vírus investigados. Para o isolamento do vírus Influenza, a linhagem de células “Madin–Darbin Canine Kidney” (MDCK) (CCL-34, ATCC) foi mantida em monocamadas num tubo com lateral achatada em meio “Roswell Park Memorial Institute 1640” (Cultilab, Brasil), ou simplesmente RPMI-1640, e suplementado de soro fetal bovino (SFB) a 10% (Cultilab, Brasil), 100µg/mL de Estreptomicina (Gibco, EUA), 100U/mL de Penicilina (Gibco, EUA) e

121,5U/mL de anfotericina B (Gibco, EUA) a 35°C e atmosfera de 5% de CO₂. Antes da inoculação das amostras, o meio de crescimento celular foi retirado e a camada de células foi lavada com meio RPMI-1640 para retirada do SFB. As amostras dos pacientes e as cepas controles de vírus Influenza foram homogeneizadas em vórtex por 30 segundos e 200µL utilizado para inoculação em garrafas contendo células MDCK, em confluência aproximada de 70% do tapete celular. As garrafas foram reincubadas, nas condições de temperatura e CO₂ descritas anteriormente, durante 2 horas para a adsorção viral. Após esse período, o meio foi trocado e as células foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 2µg/mL tripsina (Cultilab, Brasil) e incubadas a 35°C em atmosfera de 5% de CO₂. Esses tubos de cultura foram observados diariamente quanto ao aparecimento de efeito citopático durante 14 dias. Ao final desse período, ou no momento da visualização do efeito citopático, as células foram retiradas e coradas com anticorpos monoclonais específicos para influenza A e B marcados com fluoresceína e rodamina, respectivamente (Simulfluor Influenza A/B, Chemicon International, EUA).

Para o cultivo da cepa controle de hMPV foram utilizadas as células LLC-MK2 (CCL-7, ATCC), nas mesmas condições supracitadas para o vírus Influenza. Para o cultivo da cepa controle de Adenovírus sorotipo 3 foram utilizadas as células HEp-2 (CCL-23, ATCC), com algumas modificações. Após o período de 2 horas para a adsorção viral, o meio foi trocado e a garrafa foi mantida em meio “Minimal Essential Medium” (Cultilab, Brasil), ou simplesmente MEM, suplementado com 3% de Soro Fetal Bovino (Cultilab, Brasil) e incubado a 35°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após a visualização do

efeito citopático, as células foram retiradas da garrafa e, após seca ao ar, fixadas com Acetona PA (Merck, Alemanha). A revelação de cada cultura foi realizada utilizando anticorpo monoclonal específico para Adenovírus (Light diagnostic Adenovirus, Chemicon International, EUA) marcado com fluoresceína num ensaio de imunofluorescência direta (IFD) e para hMPV conforme descrito acima num ensaio de IFI.

4.7. Cultura rápida de vírus Influenza (“Shell Vial”):

As células MDCK foram cultivadas conforme descrito no item anterior, mas dentro de um tubo de vidro esterilizado contendo em seu fundo chato uma lamínula de 13mm de diâmetro. As cepas controles de vírus Influenza foram então homogeneizadas em vórtex por 30 segundos e 200µL utilizados para inoculação em cada tubo. Após esta etapa, os tubos foram centrifugados a 400rpm durante 45 minutos e adicionado o meio contendo RPMI-1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com 2µg/mL tripsina (Cultilab, Brasil), seguindo de incubação a 35°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após incubação de 72 horas, as células contidas na lamínula foram lavadas com PBS e fixadas com Acetona PA (Merck, Alemanha) gelada durante 5 minutos. As lamínulas foram transferidas para uma lâmina e fixadas com verniz para realização da revelação com anticorpo monoclonal específico, conforme descritos anteriormente no item 4.6 da metodologia.

4.8. Extração dos ácidos nucléicos:

Os ácidos nucléicos (DNA e RNA) foram extraídos diretamente das alíquotas separadas anteriormente (mantidas a -70°C) para o PCR através dos

Kits “RNeasy Total RNA Kit” e “QIAamp DNA blood Kit” (Quiagen, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. Após as extrações, os materiais foram aplicados nas respectivas reações de amplificação de genoma viral descritas a seguir.

4.9. RT-PCR para detecção de Influenza A e B:

Os iniciadores específicos usados nesse estudo para a detecção de Influenza A foram os mesmos descritos e validados em estudo anterior por Cooper e Subbarao (2000) e têm como alvo o gene codificador da proteína estrutural da matriz viral M (nucleotídeos 149 a 847). As seqüências dos iniciadores senso e anti-senso são: MF, 5'- CTC ATG GAA TGG CTA AAG ACA -3'; e MR, 5'- CGA TCA AG/TA ATC CAC AAT ATC -3'. Os iniciadores utilizados para a detecção do vírus influenza B foram inicialmente descritos e validados por Poddar (2002) e amplificam parte do gene não estrutural NS (nucleotídeos 37 a 145). As seqüências desses iniciadores senso e anti-senso são: NSF, 5'- ACA AAT TGA GGT GGG TCC G -3'; e NSR, 5'-GGC AAG TGC ACC AGC AGA ATA ACT -3'.

A reação de transcrição reversa foi realizada pela adição de 3 μ L do RNA extraído de cada amostra à mistura contendo 1.5mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs) dATP, dCTP, dGTP, e 10mM de DTT, 10 μ L de tampão para esta reação concentrado 5 vezes (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 7 μ L água de grau molecular (obtida de filtro MiliQ – Millipore, EUA), 1 μ L de cada iniciador anti-senso (MF e NSF) na concentração de 0,5 μ g/ μ L. Ao final, 100U da enzima transcriptase reversa

“Moloney Murine Leukemia Virus” (MMLV-RT) (Invitrogen, Brasil) e 10U de inibidor de RNase (Invitrogen, Brasil) foram adicionados e a mistura incubada a 42°C por 1 hora, seguido de inativação a 72°C por 15 minutos em termociclador (MJ Research Watertown, Massachusetts, EUA). A reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) do DNA complementar ao molde inicial resultante da primeira etapa (cDNA) foi realizada no mesmo tubo com a adição de uma segunda mistura contendo 1mM de dNTPs, 5U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 1µL de cada um dos iniciadores senso (MR e NSR) na concentração de 0.5µg/µL, completando o volume final da reação para 50µL com água grau molecular.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador (MJ Research Watertown, EUA) com um passo inicial de 94°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de desnaturação do DNA a 94°C por 45 segundos, hibridização dos iniciadores a 50°C por 30 segundos e síntese do DNA a 72°C por 1 minuto. No último passo, a amplificação foi completada com a extensão do tempo de síntese a 72°C por 7 minutos. Controles positivos (Influenza A/NewCaledonia/20/99 H1N1, Influenza A/Panama/2007/99 H3N2 e Influenza B/HongKong/33/01) e negativos (água grau molecular) foram incluídos em cada série de reações. O produto final da amplificação foi visualizado pela coloração com brometo de etídio em transiluminador de luz ultra-violeta (UV) após eletroforese (90V por 1 hora) em gel de agarose a 2%. A diferenciação entre os tipos de influenza foi realizada pela comparação com um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb), sendo que a banda de 698pb

corresponde indicou a positividade para o tipo A e de 108pb a positividade para o tipo B de Influenza.

4.10. PCR e nested-PCR para detecção de Adenovírus:

Para a amplificação do DNA do Adenovírus foram utilizados iniciadores que hibridizam entre as posições 21 e 322 da região codificante do gene hexon do vírus. Esses iniciadores foram descritos e validados em estudos anteriores para detecção da maioria dos subtipos de adenovírus humanos (Allard, 2001). As seqüências contêm nucleotídeos degenerados como segue: Hex1, 5'- GCC SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT C -3' e Hex2, 5'- CAG CAC SCC ICG RAT GTC AAA GT -3' na primeira reação (chamada somente de PCR); Hex3, 5'- GCC CGY GCM ACI GAI ACS TAC TTC -3' e Hex4, 5'- CCY ACR GCC AGI GTR WAI CGM RCY TTG TA -3' na segunda reação (nested-PCR).

A PCR foi realizada num volume final de 25 μ L, contendo 5 μ L de amostra extraída numa mistura com 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl (pH 9,0), 3mM de MgCl₂, 0,8 μ M de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,5 μ M de cada iniciador da polimerização (Hex1 e Hex2) e 1U de *Taq* DNA polimerase. A reação foi feita em termociclador (MJ Research Watertown, EUA) a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Uma segunda reação de amplificação (nested-PCR) foi realizada utilizando 2 μ L do produto da amplificação da primeira reação, num volume final

de 25 μ L, juntamente com 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl (pH 9,0), 3mM de MgCl₂, 0,8 μ M de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,5 μ M de cada iniciador interno ao fragmento da primeira reação (Hex3 e Hex4) e 1U de *Taq* DNA polimerase. A reação foi feita em termociclador (MJ Research Watertown, EUA) a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

As reações foram realizadas em placas de 96 escavações contendo um controle negativo (água no lugar da amostra) e dois controles positivos: uma diluição do controle positivo a ser detectada somente após a reação de nested-PCR e outra do controle positivo detectável já na primeira reação, para a confirmação de cada etapa. O resultado de cada reação foi confirmado por eletroforese de 10 μ L do material amplificado em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídio para visualização em luz UV. A confirmação do resultado positivo foi obtida pela visualização de um fragmento de aproximadamente 301pb na reação da primeira PCR somente e de 171pb na segunda reação (nested-PCR) em comparação a um marcador de peso molecular de 100pb corrido em paralelo às amostras durante a eletroforese de 90V por 1 hora.

4.11. RT-PCR para detecção de Metapneumovírus humano:

Para a detecção do hMPV foram utilizados os iniciadores descritos anteriormente por Falsey e colaboradores (2003) que têm como alvo a região conservada do gene que codifica a proteína de fusão (F) viral com 347

nucleotídeos, as seqüências são: FF, 5'- GAG CAA ATT GAA AAT CCC AGA CA -3' e FR, 5'- GAA AAC TGC CGC ACA ACA TTT AG -3'.

Para a primeira etapa de transcrição reversa, 8 µL do RNA extraído foi adicionado à mistura composta por 100U da enzima transcriptase reversa (MMLV – Invitrogen, EUA), 4µL de tampão cinco vezes concentrado (250mM Tris-HCl, pH 8,3,375mM KCl, 15mM MgCl₂), 2µL de DTT (*dithiothreitol*) a 0,1M, 1µL da mistura de dNTPs contendo 2mM de cada desoxinucleotídeo, 2µL do iniciador anti-senso FF a 25µM, 15U do inibidor de ribonuclease (*RNAguard* – Amersham Biosciences, EUA) e água grau molecular para completar 20µL. Essa mistura foi incubada a 42°C por 1 hora e inativada a 70°C por 15 minutos em termociclador (MJ Research Watertown, EUA).

A 2,5µL do produto da transcrição reversa foram adicionados 2,5µL do tampão 10 vezes concentrado (100mM Tris-HCL, pH 9, 500mM KCl, 1% Triton X-100), 2,5µL de glicerol grau molecular a 50% (Invitrogen, EUA), 2µ de MgCl₂ a 25mM, 2µL dos iniciadores FF e FR, ambos a 25µM, 0,5µL de dNTPs a 20mM, 0,5µL de *Taq* DNA polimerase (Promega, EUA) e água grau molecular suficiente para completar 25µL. A mistura foi inicialmente mantida a 95°C por 5 minutos e submetida a 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, seguido de 30 segundos a 53°C e 1 minuto a 68°C, seguido de incubação final por 10 minutos a 72°C. Os produtos foram analisados após eletroforese (90V por 1 hora) em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

4.12. Testes rápidos para detecção de Influenza:

Os testes rápidos avaliados são kits comerciais que detectam qualitativamente antígenos de Influenza A e B, diferenciando ou não entre os tipos. Os procedimentos aplicados para a realização dos testes com esses kits seguiram cada um as respectivas orientações informadas na bula fornecida juntamente com o kit. Basicamente consistem de um passo inicial de extração de antígenos da amostra com tampão próprio e a aplicação desse extraído diretamente na plataforma do teste, seguido das respectivas lavagens em alguns casos. Devido ao seu alto custo eles foram utilizados no presente estudo somente para o ensaio comparativo de limite de detecção com as cepas controles de vírus Influenza.

O kit “BD Directigen Flu A + B” (Becton Dickson, EUA) é um imunoenensaio realizado em membrana que permite a detecção e diferenciação entre Influenza A e B. O procedimento para realização desse teste envolve 10 passos e o resultado final é obtido em cerca de 15 minutos.

O kit “Quick Vue Influenza test” (Quidel, EUA) é um teste imunocromatográfico que detecta Influenza A e B, sem diferenciá-los. O procedimento envolve 3 passos, consumindo 10 minutos para a leitura final do resultado.

O kit “Xpect FluA&B” (Remel, EUA) é um ensaio imunocromatográfico que detecta qualitativamente antígenos de vírus Influenza A e B em membranas separadas, permitindo sua diferenciação. O teste é realizado em 3 passos e o tempo de leitura do resultado é de 15 minutos.

O kit “Influ-A Respi-Strip” (Coris, Bélgica) é um teste imunocromatográfico para detecção de Influenza A somente. O procedimento é realizado em 3 passos, com leitura do resultado final em 15 minutos.

O kit “SAS Influenza A e B test” (SAScientific, EUA) é apresentado em tiras imunocromatográficas separadas para a detecção dos tipos A e B de vírus Influenza. O procedimento que envolve 3 passos e leitura final em 15 minutos.

4.13. Análise estatística:

As técnicas foram comparadas entre si, considerando como método padrão-ouro o isolamento viral em cultura de células para Influenza e os testes de amplificação do genoma viral para a avaliação de Adenovírus e hMPV. Foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, concordância e valores preditivos positivo e negativo a partir de uma tabela dois por dois em software Microsoft Office Excel versão 2000.

5. RESULTADOS:

5.1. Limite de detecção para os vírus Influenza A e B:

As cepas controles de ambos os subtipos (H3N2 e H1N1) de Influenza A foram detectadas até a diluição 10^{-7} e a cepa do Influenza B até a diluição 10^{-5} pela cultura clássica. A maior diluição em que se detectou a presença de vírus nesse ensaio de isolamento viral em cultura de células MDCK foi atribuído o valor arbitrário equivalente a 1 TCID₅₀ (50% *Tissue Concentration of Infectious Dose*). A tabela 1 mostra o comparativo dos limites de detecção para as três cepas controles de vírus Influenza em todos os demais testes em relação ao TCID₅₀ determinado pela cultura de células pelo método clássico.

As mesmas diluições das três cepas controles de vírus Influenza foram submetidas à detecção no ensaio de cultura viral rápida, descrita como “Shell Vial”. Utilizando a mesma linhagem de células MDCK, porém com incubação por 72 horas e revelado por imunofluorescência (Chemicon Int, Temecula) foi possível detectar até as diluições 10^{-7} para os subtipos de Influenza A e 10^{-5} para o Influenza B. O limite de detecção para as três cepas controles de vírus Influenza foram considerados iguais aos da cultura clássica (1TCID₅₀).

Aplicando o protocolo de RT-PCR descrito na metodologia detectaram-se os dois subtipos de Influenza A até a diluição 10^{-8} e da cepa controle de Influenza B até a diluição 10^{-5} . O limite de detecção da RT-PCR foi equivalente

a 0,1 TCID₅₀ para ambos os subtipos de Influenza A (H3N2 e H1N1) e 1 TCID₅₀ para o Influenza B.

Tabela 1: Limites de detecção* comparativos entre os diferentes testes obtidos para três cepas controles de vírus Influenza.

Teste	H3N2	H1N1	Influenza B
Cultura de células	1	1	1
Shell vial	1	1	1
RT-PCR	10 ⁻¹	10 ⁻¹	1
Quick Vue Influenza test	10 ⁴	10 ³	10 ²
BD Directigen Flu A+B	10 ⁴	10 ⁴	10 ³
Xpect Flu A&B	10 ⁴	10 ⁴	10 ³
Influ-A Respi-Strip	10 ⁵	10 ⁵	-
SAS Influenza A e B	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶

* O limite de detecção refere-se ao TCID₅₀ obtido em cultura de células;

O kit “BD Directigen Flu A+B” foi capaz de detectar até a diluição 10⁻³ das duas cepas de Influenza A e 10⁻² de Influenza B, resultando em limite de detecção de 10⁴ TCID₅₀ e 10³ TCID₅₀, respectivamente. O kit “Quick Vue Influenza test” detectou diluições distintas entre os subtipos de Influenza: 10⁻⁴ do subtipo H1N1, 10⁻³ do H3N2 e 10⁻² do influenza B, indicando que os limites de detecção para Influenza A H1N1, H3N2 e B são 10⁴, 10³, e 10³ do TCID₅₀, respectivamente. O kit “Xpect FluA&B” foi capaz de detectar até a diluição 10⁻⁴ de ambos os subtipos de Influenza A e 10⁻² de Influenza B, que equivalem a

10^4 TCID₅₀ para Influenza A e 10^3 do TCID₅₀ para Influenza B. O kit “Influ-A Respi-Strip” detectou até a diluição de 10^{-2} para as duas cepas de Influenza A, conferindo limite de detecção equivalente a 10^5 do TCID₅₀. Os testes “SAS Influenza A” e “SAS Influenza B” apresentaram positividade somente para as diluições 10^{-1} de ambos os tipos e subtipos testados, com limite de detecção de 10^6 do TCID₅₀.

5.2. Comparação entre cultura de células, RT-PCR e Imunofluorescência direta para identificação de Influenza A e B em amostras clínicas:

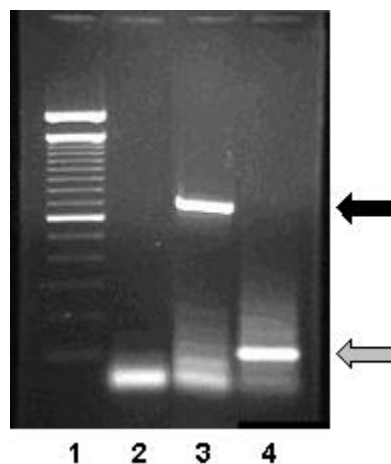
A detecção de vírus Influenza ocorreu em 78 das 404 amostras avaliadas pelo método de isolamento em cultura de células, sendo 46 Influenza tipo A e 32 Influenza tipo B. O tempo mediano de cultura até a visualização de efeito citopático sugestivo de proliferação viral foi de 4 dias (média de 4,8 dias), sendo que 91,9% dessa detecção ocorreu dentro dos primeiros 7 dias de incubação.

A detecção do vírus Influenza pelo método de imunofluorescência direta (IFD) foi possível em 84 das 412 amostras analisadas, sendo 49 Influenza tipo A e 35 Influenza tipo B. A celularidade das amostras foi considerada boa ou ótima (acima de 20 células por campo de observação) em cerca de 80% das lâminas, sendo este indicativo da presença de no mínimo 20 células por campo observado ao microscópio, após a coloração da IFD. Todas as amostras foram consideradas adequadas para avaliação por este método devido à visualização

de mais que 20 células epiteliais após a revelação da lâmina em microscópio de epifluorescência.

O método de RT-PCR detectou 77 amostras positivas das 412 investigadas para o vírus Influenza, sendo 45 tipo A e 32 tipo B. A figura 1 mostra o resultado obtido na RT-PCR, permitindo a detecção diferenciada dos vírus Influenza tipo A (698pb) e tipo B (108pb) pelos tamanhos dos fragmentos obtidos após a separação por eletroforese em gel de agarose.

Figura 1: Resultado da RT-PCR para detecção de vírus Influenza.



Da esquerda para a direita: 1, peso molecular (100pb); 2, controle negativo; 3, Influenza A (seta preta, 698pb); 4, Influenza B (seta cinza, 108pb).

Para o ensaio comparativo entre as diferentes técnicas para a detecção de vírus Influenza A e B foram consideradas as 404 amostras avaliadas em paralelo por cada um dos ensaios. Ao final, 71 amostras foram positivas e 317 negativas nos três testes aplicados que resultou numa concordância geral de

96%. Os resultados de detecção em cada um dos testes são mostrados na tabela 2.

Ao todo, 16 amostras demonstraram resultados discordantes. Nove amostras foram positivas na IFD e negativas na cultura, sendo a RT-PCR positiva em 5 delas. Outras 5 amostras foram positivas na cultura e negativas na IFD, com apenas uma delas positivo na RT-PCR. Duas amostras foram positivas nas técnicas de cultura e IFD e negativas pela RT-PCR. Nenhuma amostra foi detectada somente pela técnica de RT-PCR.

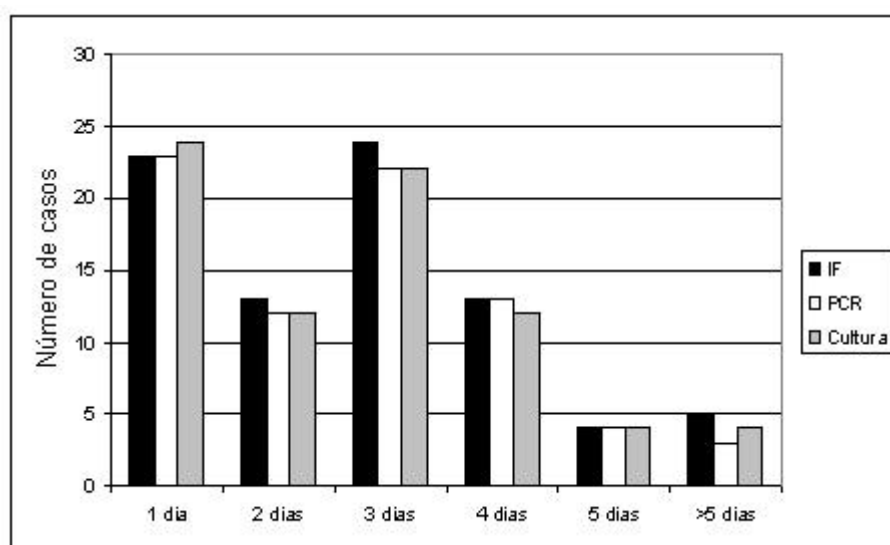
Tabela 2: Comparação da detecção de Influenza A e B em 404 amostras através de isolamento em cultura de células, IFD e RT-PCR.

Cultura	IFD	RT-PCR	Número de amostras (%)
+	+	+	71 (17,5)
+	+	-	2 (0,5)
+	-	+	1 (0,25)
+	-	-	4 (1,0)
-	+	+	5 (1,25)
-	+	-	4 (1,0)
-	-	+	0
-	-	-	317 (78.5)

Considerando a cultura como o método padrão-ouro para a detecção de vírus Influenza, obtivemos os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo para a RT-PCR de 92,3%, 98,5%, 93,5% e 98,2%, respectivamente. Os valores correspondentes para a IFD foram 93,6%, 97,2%, 89% e 98,5%.

A detecção de vírus Influenza foi obtida em pacientes que apresentavam mediana de 3 dias de início dos sintomas (média de 2,95 dias), sem diferenças significativas entre as diferentes técnicas aplicadas. A figura 2 mostra a distribuição dos resultados de diferentes testes conforme o tempo de sintomas apresentado pelo paciente no momento da coleta da amostra.

Figura 2: Distribuição dos casos de Influenza detectados pelas diferentes técnicas com relação ao número de dias entre o início dos sintomas e a coleta da amostra.



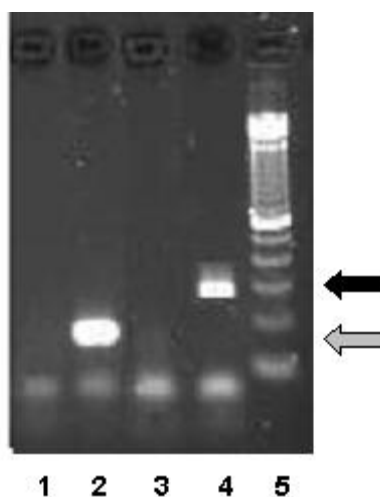
5.3. Comparação de detecção de Adenovírus por IFD, PCR e Nested-PCR:

Todas as 412 amostras submetidas à detecção de adenovírus pelo método de IFD descrita na metodologia foram negativas.

A reação de detecção de Adenovírus foi otimizada utilizando como parâmetro a diluição seriada da cepa controle de Adenovírus sorotipo 3 testada por cultura celular. Em cultura celular a maior diluição detectável foi a 10^{-4} e na PCR houve detecção até 10^{-3} para a primeira reação e 10^{-8} na reação do nested-PCR. Estes resultados apontam para um limite de detecção da PCR equivalente a 10 TCID₅₀ e para o nested-PCR de 10^{-4} TCID₅₀.

As 412 amostras avaliadas para a detecção de Adenovírus foram submetidas ao ensaio de nested-PCR, mas a visualização dos resultados foi feita após cada etapa de amplificação. Nenhuma amostra foi considerada positiva, na visualização em gel, após a primeira reação de PCR e 17 foram consideradas positivas após a reação de nested-PCR. Todas as reações foram realizadas em placa de 96 microtubos, contendo controles negativos para as duas etapas da reação, bem como um controle positivo para a reação da PCR (diluição 10^{-4}) e um controle para a reação de Nested-PCR (diluição 10^{-8}) como exemplificado na figura 3.

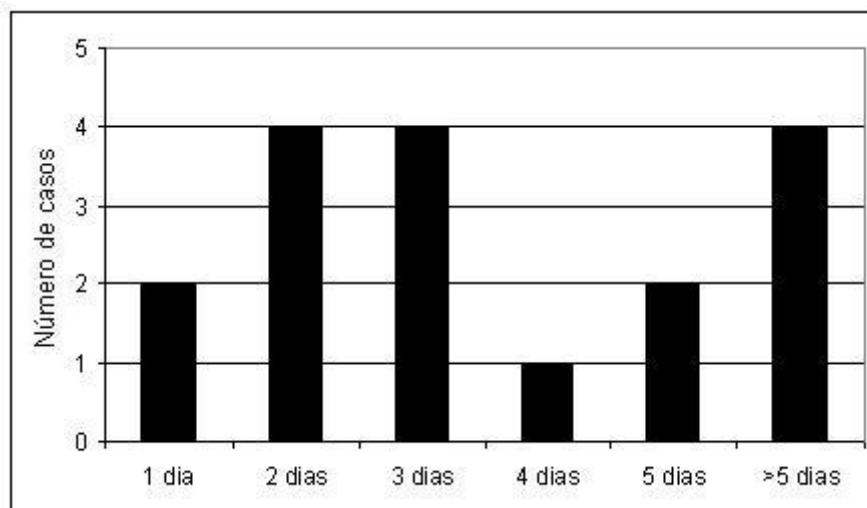
Figura 3: Visualização do gel com os resultados dos ensaios moleculares para Adenovírus.



Da esquerda: 1, controles negativo; 2, diluição 10^{-8} do controle positivo (seta cinza, 171pb) do Nested-PCR; 3, controles negativo; 4, diluição 10^{-3} do controle positivo da PCR (seta preta, 301pb).

A figura 4 mostra distribuição dos casos de detecção do Adenovírus pela nested-PCR conforme o tempo de início dos sintomas apresentados pelos pacientes no momento da coleta da amostra. As 17 amostras positivas na reação de nested-PCR para Adenovírus apresentaram mediana de 3 dias do início dos sintomas (média de 5 dias), sendo que seis (35%) apresentavam 5 dias ou mais no momento da coleta.

Figura 4: Distribuição de casos de infecção por Adenovírus detectados pela nested-PCR em relação ao número de dias após o início dos sintomas até a coleta da amostra.

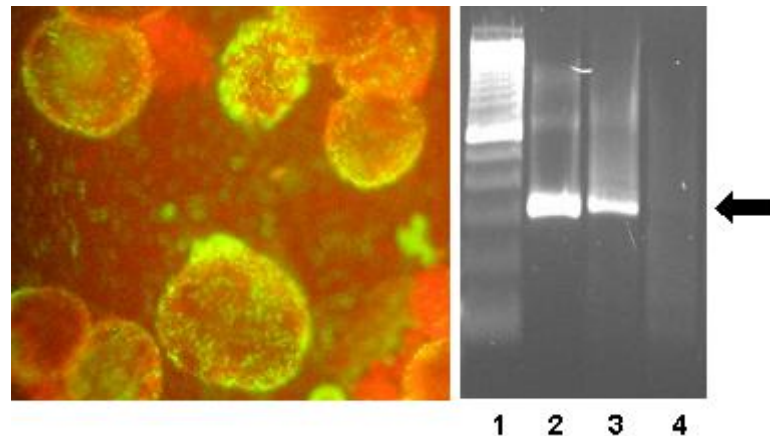


5.4. Comparação de detecção de hMPV por RT-PCR e IFI:

Devido à limitação de volume do reagente disponível para a técnica de IFI (anticorpo monoclonal gentilmente cedido pelo CDC, EUA) foram selecionadas para a comparação de métodos na detecção de hMPV somente as amostras consideradas negativas para os demais vírus estudados (VSR, Influenza, Parainfluenza, Rinovírus, Enterovírus, Coronavírus OL43 e 229E) aplicando a metodologia descrita em estudo anterior (Bellei, 2007b). Dentre as 185 amostras selecionadas, 8 casos não possuíam lâminas reservas congeladas e, portanto o comparativo entre IFI e RT-PCR só pode ser aplicado em 177 amostras. A amplificação do genoma viral pela reação de RT-PCR

demonstrou 22 amostras positivas, ao passo que a revelação pelo método de IFI detectou 10 amostras positivas (figura 5).

Figura 5: Detecção de hMPV por IFI e RT-PCR.



À esquerda, células epiteliais do trato respiratório de paciente infectado com hMPV revelada por IFI; À direita, RT-PCR para hMPV: 1, peso molecular (100pb); 2 e 3, controles positivos (seta preta, 347pb); 4, controle negativo.

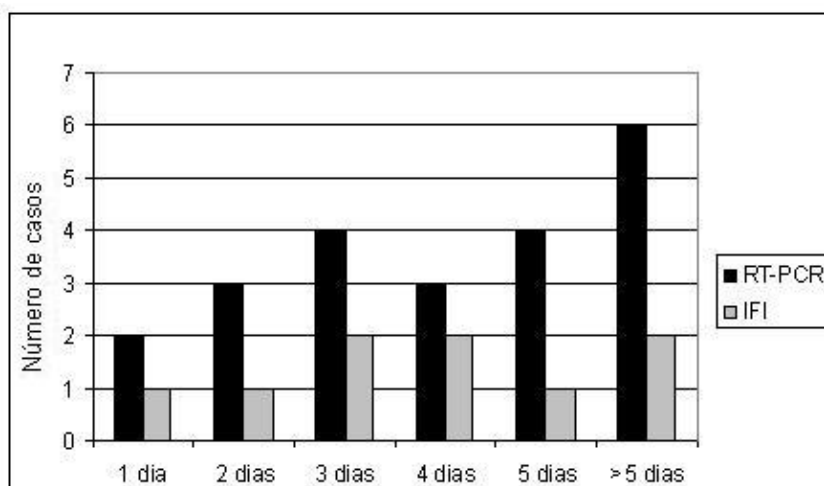
Em três amostras foram observadas colorações inespecíficas após a revelação por IFI que impediram a conclusão quanto a um resultado definitivo nesse teste. Estas amostras foram consideradas como resultado indeterminado e, por isso, foram excluídas da análise de desempenho entre estas duas técnicas. Todas as amostras detectadas pela IFI foram também detectadas na RT-PCR (tabela 3) e, considerando o teste molecular como o padrão-ouro, obtivemos os valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos negativo e positivo de 45,5%, 100%, 92,7% e 100%, respectivamente.

Tabela 3: Comparação entre IFI e RT-PCR para a detecção de hMPV em 174 amostras clínicas:

IFI / RT-PCR	Positivo	Negativo	Total
Positivo	10	0	10
Negativo	12	152	164
Total	22	152	174

Na figura 6 temos a distribuição de amostras positivas para hMPV conforme o teste aplicado e o tempo de início dos sintomas até o momento da coleta da amostra. Há uma diferença, não significativa, de distribuição, onde 10 (45,5%) das amostras positivas na RT-PCR apresentavam 5 dias ou mais de tempo de coleta e, destas, somente 3 foram positivas na IFI. Dentre as 12 amostras com resultados discordantes, a maioria (7 casos) apresentava pelo menos 5 dias de início dos sintomas no momento da coleta.

Figura 6: Distribuição das amostras positivas em cada teste para hMPV de acordo com o tempo de início dos sintomas no momento da coleta.



6. DISCUSSÃO:

Há poucos anos atrás, a detecção de vírus respiratórios era limitada aos métodos laboratoriais de isolamento em cultura de células. Dessa forma, os serviços diagnósticos obtinham confirmação etiológica viral em menos da metade dos casos de infecções respiratórias agudas. Geralmente, incluíam-se os vírus Influenza A e B, Parainfluenza 1, 2 e 3, Vírus Sincicial Respiratório, Adenovírus e alguns Enterovírus. Nas últimas décadas, em grande parte devido ao avanço tecnológico alcançado dentro dos laboratórios de virologia, tem se obtido um considerável aumento nas taxas de detecção de vírus causando infecções respiratórias. A introdução de metodologias de detecção molecular, por exemplo, permitiu uma melhor investigação de vírus como o grupo dos Rinovírus, que passaram a figurar entre os mais freqüentes nas infecções do trato respiratório superior (Halonen et al, 1996). Associado a isso, a descrição de novos agentes virais causando importantes infecções respiratórias, entre eles o Metapneumovírus humano (hMPV), tem contribuído, em muito, para o aumento da elucidação etiológica dessas doenças. (Fouchier et al, 2005).

Atualmente, vários relatos da literatura apontam para investigação etiológica de infecções respiratórias agudas com detecção viral em mais de 60% dos casos (Arden et al, 2006; Bellau-Pujol et al, 2005; Chung et al, 2007; Freymuth et al, 2006; Jacques et al, 2006; Koetz et al, 2006). No entanto, esses resultados representam uma investigação exaustiva em laboratórios de

pesquisa e aplicação de diversos ensaios disponíveis, sem a análise do custo final por amostra identificada.

Diante da grande diversidade de técnicas possíveis de serem aplicadas no diagnóstico de infecção por vírus respiratórios, algumas considerações devem ser feitas. Inicialmente devemos pontuar sobre a diferente capacidade de detecção de cada metodologia. Classicamente, o método considerado o padrão-ouro com o qual todos os demais testes são comparados é o isolamento viral em cultura de células, pois esse é o teste que detecta a presença de vírus viáveis na amostra. As técnicas de amplificação do genoma não prescindem da presença de vírus com poder infectante e há menor interferência dos processos de coleta, armazenamento e do procedimento técnico. Deste modo, alguns autores sugerem a substituição do padrão-ouro de detecção viral pelas técnicas de detecção de genoma viral, particularmente, se o vírus em questão não replica de forma adequada em cultura de células ou a detecção é muito inferior às técnicas de amplificação do genoma (Templeton, 2006).

O desempenho de um teste laboratorial é determinado inicialmente pelas características inerentes ao alvo de sua detecção. Como suas capacidades de detecção são diferentes é esperado que suas sensibilidades analíticas sejam diferentes.

6.1. Influenza:

A primeira etapa do presente estudo avaliou a capacidade de detecção de algumas metodologias diagnósticas disponíveis para a detecção de vírus

Influenza. A amplificação do genoma viral e técnicas de detecção de antígenos virais, descritos como testes rápidos, foram comparados com os métodos de isolamento viral em cultura de células, tanto pelo método clássico quanto em “shell vial”. O ensaio de limite de detecção com três diferentes cepas controles de vírus Influenza obteve resultados diferentes para cada metodologia e, em alguns casos, diferença entre os tipos e subtipos de vírus Influenza avaliados pelo mesmo teste.

Os resultados mostrados na tabela 1 (página 34) demonstram resultados comparativos entre os limites de detecção para diferentes metodologias na detecção de cepas de vírus Influenza. Embora os experimentos tenham sido realizados com três diferentes cepas controles, seus resultados não podem ser totalmente extrapolados para uma rotina com maior número de amostras. Como o objetivo desse experimento não era calcular o TCID₅₀/mL, mas sim nos dar um parâmetro comparativo entre a capacidade de detecção de cada teste, consideramos a maior diluição detectável em cultura arbitrariamente como 1TCID₅₀. Considerando este critério é interessante observar os valores próximos obtidos entre os ensaios de isolamento em cultura de células, “shell vial” e RT-PCR.

Alguns estudos já demonstraram desempenho similar do “shell vial” com células MDCK em relação à cultura clássica (Lee et al, 1992; Shih et al, 1999). Em relação aos testes rápidos demonstramos que o limite de detecção das cepas controles de influenza pelo “shell vial” foi até 10⁶ vezes superior, resultados semelhantes ao descrito na literatura (George et al, 2002). O “shell

vial” tornou-se a opção de cultura viral em muitos laboratórios de rotina em virologia, mas ainda exige 48-72 horas para seu resultado, limitando sua ampla utilização pelos clínicos (Leland et al, 2007). Uma alternativa disponível nos últimos anos nos EUA são “shell vials” com co-cultivo de diferentes tipos celulares comercializados já prontos para uso e, por isso, indisponíveis aqui no Brasil. Este sistema tem mostrado bons resultados não só para a detecção de influenza, mas também permitem a detecção de VSR, Parainfluenza e Adenovírus em cerca de 24-48 horas (Navarro-Mari et al, 1999; Fong et al, 2000; Dunn et al, 2004; Weinberg et al, 2004; LaSala et al, 2007).

Vários autores demonstraram elevada sensibilidade nas reações de amplificação de genoma viral, como a PCR (Cox et al, 1999). No presente estudo, podemos comprovar uma maior capacidade de detecção por este teste, embora pequena diferença e somente para os subtipos de vírus Influenza A. A avaliação do limite de detecção em nosso experimento demonstrou ser equivalente à cultura para o tipo de vírus Influenza B e 10 vezes menor para os dois subtipos de Influenza A avaliados. Relatos de pequeno incremento (1-100 vezes o TCID₅₀/mL) na capacidade de detecção de Influenza por testes de amplificação de genoma viral tem sido publicados (Poddar, 2002; Choi et al, 2002; Schweiger et al, 2000). Alguns autores sugerem que um maior aumento pode ser alcançado pelo acréscimo de um sistema para a detecção do produto da reação de amplificação, como o sistema de biotina-avidina em plataforma de ELISA (Chaharaein et al, 2006; Munch et al, 2001) ou detecção de fluorocromos no sistema de PCR em tempo real (Poddar, 2003).

Os testes rápidos vêm sendo usados cada vez mais nos últimos anos, pois permitem fornecer um resultado em tempo hábil para o início do tratamento específico, que necessita ser precoce. Em recente revisão, a sensibilidade na detecção de antígenos de Influenza em amostras clínicas de pacientes de diferentes idades, destes testes, em raros casos, foi inferior a 50% (Leland et al, 2007). Contudo, estudos que determinam a sensibilidade analítica dos diferentes testes disponíveis ainda são pouco explorados. Beigel e colaboradores (2005) relataram baixa sensibilidade analítica dos testes rápidos no diagnóstico da infecção humana pelo vírus Influenza aviário do subtipo H5N1, no sudoeste da Ásia, contra-indicando o uso destes testes em casos suspeitos desta infecção. No entanto, Chan e colaboradores (2007) compararam a capacidade de detecção por este tipo de teste entre os vírus Influenza aviário e os vírus Influenza de circulação sazonal na espécie humana. Os resultados obtidos para os subtipos de Influenza A, H1 e H3 que prevalecem circulando na espécie humana desde a década de 70, mantiveram a mesma baixa capacidade de detecção que obtido para os subtipos H5N1.

A detecção de diferentes tipos e subtipos de vírus Influenza em nosso experimento foi muito inferior em relação às demais metodologias. O limite de detecção para os testes rápidos variou entre 10^3 e 10^6 vezes inferior ao isolamento em cultura de células. Este resultado está de acordo com os experimentos citados anteriormente de Chan e colaboradores (2007) em que o limite de detecção foi no mínimo 10^3 vezes inferior para os testes “QuickVue Influenza test” e “BD Directigen Flu A+B”. Em ensaio similar, Fedorko (2006)

descreveu limite de detecção 10^6 vezes inferior ao isolamento de vírus influenza para o kit “BD Directigen Flu A+B”.

Apesar da capacidade de detecção ser pequena em relação ao padrão-ouro a literatura aponta para razoáveis taxas de sensibilidade dos testes rápidos em amostras clínicas. Dentre os kits avaliados, o mais estudado foi o “BD Directigen Flu A+B”, com vários estudos apontando para valores de sensibilidade entre 29 e 90%, conforme o autor (Grondahl, 2005; Yamazaki, 2000). O kit “Quick Vue influenza test” apresentou resultados semelhantes ao kit anterior nos estudos publicados até o momento, com sensibilidade variando entre 33 e 91% (Stein et al, 2005; Ruest et al, 2003). O kit “Xpect Flu A&B”, em apenas um relato disponível obteve sensibilidade de 94% (Cazacu, 2004). Os demais kits não estão contemplados em estudos divulgados na base de dados MEDLINE e LILACS, não permitindo comparações.

O valor da sensibilidade analítica do kit “BD Directigen Flu A+B” para o subtipo H1N1 foi de $2,9 \times 10^4$ TCID₅₀/ml, em estudos de infecção experimental (Kaiser et al, 1999b). Considerando à história natural da infecção pelo vírus Influenza, estudos anteriores de infecção experimental em pessoas saudáveis documentaram que o pico de excreção viral ocorre após 48 horas de infecção e atinge cerca de 10^3 a 10^7 TCID₅₀/ml (Wright et al, 2001). Portanto, desde que o teste seja aplicado no pico de excreção viral, a faixa de detecção demonstrada na literatura e em nossos experimentos está de acordo com os níveis de excreção viral. Dessa forma, um fator determinante da sensibilidade clínica dos testes rápidos parece ser o tempo decorrido desde o início da infecção até a

realização do teste. É de fundamental importância que os pacientes a serem testados apresentem-se dentro desse período de alta excreção viral.

Na segunda etapa do presente estudo, analisando 404 amostras clínicas de adultos sintomáticos encontramos concordância de 96% dos resultados obtidos nas três metodologias aplicadas para a detecção do vírus Influenza A e B: RT-PCR, isolamento viral e IFD. Não há estudos comparando os mesmos protocolos aqui utilizados para as técnicas de IFD, RT-PCR e cultura viral. As diferenças mais relevantes devem-se a variações dos ensaios de amplificação do genoma viral, pois apesar do grande número de estudos avaliando essa metodologia, há grandes diferenças de protocolos, principalmente na variação de genes alvos dos iniciadores da amplificação. Habib-Bein e colaboradores (2003) encontraram concordância de 92% entre IFD, isolamento viral e RT-PCR em tempo real nas 238 amostras do trato respiratório investigadas. A sensibilidade da IFD foi de 98,7% e da RT-PCR em tempo real de 95,3% em relação ao isolamento viral em cultura de células.

Alguns autores têm reportado extrema variabilidade nos resultados obtidos para o isolamento viral em cultura de células (Carman et al, 2000; CLSI, 2006). Esse procedimento, apesar de ser o padrão-ouro de detecção em virologia está sujeito a muitas variações, que implicam diretamente na capacidade de recuperação de vírus Influenza e conseqüentemente com o desempenho da cultura viral, em relação aos demais testes ao qual esta é comparada. O pior desempenho da cultura viral muito provavelmente decorre de prática de cultura celular pouco otimizada, da dificuldade no manuseio,

seleção e manutenção da qualidade da cultura celular, além das dificuldades de detecção e identificação do isolado viral relacionado ao próprio tropismo viral (CLSI, 2006).

No presente estudo, os procedimentos para o isolamento viral foram otimizados seguindo as mais rigorosas orientações de boas práticas de cultivo de células e isolamento de vírus Influenza. As células MDCK utilizadas foram sempre de menor número de passagens possíveis (entre 70 e 80), foi realizada lavagem com MEM puro para a remoção do SFB presente no meio de crescimento celular antes da inoculação do material clínico e, após a inoculação do material, em meio RPMI-1640 sem SFB, foi adicionado tripsina e incubado durante duas semanas. As demais variáveis interferentes do isolamento viral foram bem controladas, como o transporte imediato da amostra ao laboratório e seu imediato congelamento à -70°C. O tempo de transporte de uma amostra antes do seu devido armazenamento é bem conhecido como inversamente relacionado à recuperação de vírus através da cultura de células, fator que tende a favorecer métodos moleculares, pois ocorre uma queda considerável na quantidade de vírus viáveis na amostra (CLSI, 2006).

Vários estudos têm empregado a metodologia de amplificação de genoma viral para o diagnóstico da infecção por influenza. Diversas variações na metodologia molecular têm sido descritas, desde o protocolo mais simples como a RT-PCR (Atmar et al, 1996; Steininger et al, 2002), o formato de RT-PCR com dupla detecção de genes (Herrmann et al, 2001; Stone et al, 2004), ou a RT-PCR em reações para detecção de múltiplos vírus simultaneamente

(Daum et al, 2002). Variações metodológicas para a detecção do material amplificado na reação também são observadas: a eletroforese em gel de agarose (Cooper et al, 2000), a hibridização (Liolios et al, 2001), imunoenensaio enzimático (Cherian et al, 1994), ou a leitura de marcadores fluorogênicos a cada ciclo de amplificação na reação em tempo real (Habib-Bein, 2003).

No presente estudo, foi otimizada e aplicada uma reação no formato de RT-PCR para a detecção de Influenza, com visualização diferencial dos tipos virais A e B, em gel de agarose, após separação por eletroforese. A padronização de um protocolo simples e de custo otimizado resultou em uma reação final de RT-PCR com 92% de sensibilidade para detecção de Influenza em amostras de adultos com infecção respiratória aguda. Este resultado é semelhante a outros estudos de comparação com o isolamento viral que utilizaram protocolos similares (Atmar et al, 1996; Boivin et al, 2001; Steininger et al, 2002), ou mesmo àqueles que utilizaram sistemas de detecção mais complexos e onerosos como reação de RT-PCR em tempo real (Habib-Bein et al, 2003).

Na tabela 2 (página 37) observamos que não houve a detecção de Influenza pela técnica de RT-PCR de forma isolada, em nenhuma amostra. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar esse fenômeno. Nas 10 amostras positivas na cultura e/ou IFD que não foram amplificadas na RT-PCR pode ter ocorrido degradação de ácidos nucleicos, durante o período em que permaneceram estocadas antes da sua extração. A inibição ou perda de RNA do vírus Influenza tem sido descrita com freqüência em torno de 5% em estudo

com amostras estocadas devido, principalmente, a presença de enzimas que degradam RNA de amostras biológicas (Wallace et al, 1999). Outra possibilidade é que não tenha ocorrido a hibridização dos iniciadores da PCR devido ao pareamento insuficiente dos nucleotídeos presentes no vírus da amostra como consequência de mutações. Contudo, os genes alvos da detecção do protocolo da RT-PCR utilizada são genes internos, considerados de baixa variabilidade viral, o gene de matriz para o Influenza A e o gene não-estrutural para o influenza B, suas seqüências foram determinadas e validadas para reconhecer todas as variantes dos subtipos de influenza A H1N1 e H3N2 (Cooper et al, 2000) e do Influenza tipo B (Poddar, 2002).

Outra hipótese que pode ter contribuído para a não demonstração de superioridade da RT-PCR na detecção de Influenza pode estar relacionada ao período de coleta das amostras. Cherian e colaboradores (1994) demonstraram vantagem maior dos protocolos de amplificação de genoma viral, particularmente em relação ao isolamento viral, se as amostras são obtidas de pacientes infectados (estudo experimental) com mais de 4 dias após o início dos sintomas. Este fenômeno deve-se ao fato de que a concentração de vírus viáveis na secreção nasofaríngea diminui rapidamente após os primeiros dias de infecção. Em nosso estudo as amostras foram coletadas de pacientes com 3 dias (mediana) de início dos sintomas (figura 2, página 38). É possível que a busca precoce pela assistência médica dos pacientes para o estudo não represente a realidade de outros serviços ambulatoriais e, assim, a metodologia de RT-PCR pode apresentar mais vantagens do que a observada neste estudo.

A metodologia de imunofluorescência para a detecção de antígenos virais em células do epitélio respiratório infectadas pode apresentar resultados de difícil comparação entre diferentes laboratórios, uma vez que cada local deve ter sua política de monitoramento constante da qualidade. Além de funcionários continuamente treinados, as recomendações para melhorar a qualidade no serviço de imunofluorescência incluem: a concentração das células do paciente através da centrifugação da amostra antes da preparação das lâminas, o uso de reagentes de alta qualidade sempre validados antes do uso e monitorados quanto à estabilidade, uma sala adequadamente escura, microscópio de epifluorescência de qualidade, com trocas constantes de lâmpada e acompanhamento da intensidade do brilho emitido (Habib-Bein et al, 2003).

Em nossa rotina laboratorial, todas essas recomendações são continuamente empregadas e provavelmente contribuíram para o bom desempenho alcançado pelo ensaio de IFD na detecção do vírus Influenza. Todas as amostras positivas na IFD com resultado negativo na cultura e na RT-PCR apresentaram visualização de 10 ou menos células positivas na lâmina observada ao microscópio. Como o ensaio de IFD foi o único em que houve concentração das amostras através da centrifugação prévia do material, isto pode também ter contribuído para a otimização e melhor desempenho deste ensaio em relação aos demais.

Landry e Ferguson (2003) demonstraram anteriormente discrepâncias na comparação de testes diagnósticos de Influenza quando poucas células

positivas são visualizadas na IFD, porém com comprovação da sensibilidade da IFD após testes com protocolos adicionais. A especificidade desses resultados discordantes pode ser comprovada através da RT-PCR (tabela 2, página 37): cinco amostras positivas na IFD e negativas na cultura. Recentemente, alguns autores sugerem a amplificação molecular dos genes virais como uma alternativa ao isolamento viral no papel de padrão-ouro (Wallace, 1999). Assim, poderíamos considerar estas cinco amostras com resultados na IFD e RT-PCR como positivos. Neste caso, das 83 amostras positivas no total o ensaio de IFD detectou 82, o que resulta em aumento da especificidade de 93% para 98,75% e ao valor preditivo positivo de 89% para 95%.

6.2. Adenovirus:

Na primeira etapa do estudo, em experimento utilizado para a otimização dos testes moleculares através da comparação com o limite de detecção obtido em cultura de células, não conseguimos um bom rendimento na detecção da cepa controle de Adenovirus com apenas uma reação de amplificação. No entanto, conseguimos resultado de 10^4 vezes superior à cultura pela técnica de nested-PCR para o controle de Adenovirus sorotipo 3 avaliado. Não foi possível comparar dados da literatura, pois não foram encontrados estudos similares de comparação de limite de detecção para o adenovirus por diferentes metodologias (Espy et al, 2006). No entanto, em estudo comparativo de técnicas de detecção de Adenovirus, Fujimoto e colaboradores (2004) demonstraram que a capacidade de detecção do teste molecular de

amplificação do genoma viral apresentou limite de detecção de 10^2 a 10^5 vezes maior que um teste de detecção de antígenos virais.

Apesar dos bons resultados encontrados para a IFD na detecção de vírus influenza em amostras clínicas de adultos com infecção respiratória aguda, os mesmos resultados não foram reprodutíveis quando fizemos a mesma comparação dessa técnica com a amplificação do genoma viral para o Adenovírus. Em nosso estudo, a investigação de Adenovírus como agente etiológico de infecção respiratória aguda em 412 adultos não resultou em nenhum caso pela investigação pela técnica de IFD. A detecção só foi possível através da técnica de amplificação de genoma viral após duas reações de amplificações, o nested-PCR. Esse resultado demonstra a necessidade de uma maior amplificação de genoma para visualizarmos a presença do vírus nas amostras de pacientes adultos. Alguns autores já haviam sugerido que métodos de detecção de antígenos de Adenovírus em amostras do trato respiratório podem apresentar sensibilidade similar à cultura de células, mas muito inferior a PCR (Raty et al, 1999).

Especificamente sobre a dificuldade de detecção de Adenovírus em amostras do trato respiratório de adultos pela técnica de IFD, Larranaga e colaboradores (2007) demonstraram a impossibilidade da técnica em detectar surtos de transmissão hospitalar por esse vírus. Nesse estudo a IFD obteve melhores resultados que a cultura celular para a identificação dos casos índices em crianças, mas falhou em detectar mais da metade dos casos de transmissão para os profissionais contactantes destes casos. Para estes casos

de infecção secundária por Adenovírus em adultos a melhor técnica de detecção foi a PCR, sugerindo a necessidade de técnicas de maior sensibilidade para o diagnóstico de Adenovírus nessa população.

6.3. Metapneumovírus humano:

Os resultados obtidos da detecção de hMPV em 177 amostras clínicas de adultos com infecção respiratória aguda resultou em sensibilidade comparativa para a IFI de 45%. Apesar do recente desenvolvimento dos anticorpos monoclonais específicos para o hMPV, alguns trabalhos já descreveram sensibilidade comparativa em relação ao RT-PCR entre 66,6% e 80% (Ebihara, 2005; Gerna, 2007; Landry, 2005; Percivalle, 2005). Contudo, todos estes estudos foram realizados essencialmente em amostras coletadas de crianças.

O primeiro trabalho sobre excreção viral do hMPV sugere baixa replicação no trato respiratório de adultos, o que explicaria porque o desempenho dos testes não moleculares é melhor em crianças (Kuypers, 2005). Diante desta informação, sugerimos estudos comparativos em diferentes faixas etárias para confirmar a menor sensibilidade da IFI em adultos. A exemplo do que acontece com o VSR, há detecção diferenciada conforme a idade, principalmente, quando utilizado testes de menor sensibilidade (Casiano-Colon et al, 2003). Além disso, também já foi demonstrado que o hMPV, em comparação ao VSR outro componente da família dos Paramyxoviridae, tem menor replicação tanto no trato respiratório superior quanto no inferior (Huck et al, 2007).

Além do fator já mencionado referente à idade dos pacientes, a IFI pode ter apresentado rendimento inferior ao apontado pela literatura devido à apresentação mais tardia dos pacientes infectados pelo hMPV. Nossos resultados demonstraram que dos 12 casos discordantes entre os testes (figura 6, página 43), 7 apresentaram-se com pelo menos 5 dias de sintomas no momento da coleta. Em estudo de infecção por hMPV experimental demonstrou-se perfil de replicação viral limitado a células ciliadas do trato respiratório e com pico de excreção viral no quarto dia após a infecção, com excreção viral em declínio até o décimo dia após a infecção (Kuiken et al, 2004). Desse modo, podemos sugerir que, a exemplo da discussão em torno da história natural da infecção pelo vírus influenza, o tempo de coleta da amostra parece ser importante também para a detecção do hMPV por testes não moleculares, principalmente em adultos.

A técnica de detecção de hMPV por IFI ainda necessita de aprimoramentos, pois as dificuldades da leitura devido a colorações fluorescentes inespecíficas já foi relatado por outros autores. Entretanto, os mesmos autores sugerem como boa alternativa utilizar os mesmos anticorpos, disponíveis atualmente, na cultura viral pelo método “shell vial” (Landry et al, 2005). Enfim, é importante a transferência destas técnicas para outros laboratórios, bem como o desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais. Outros avanços em detecção de hMPV a partir do desenvolvimento de anticorpos monoclonais podem resultar em testes no formato imunocromatográficos, ditos testes rápidos, que estão em fases iniciais de avaliação (Kikuta et al, 2007)

Neste panorama, apesar das dificuldades da padronização da RT-PCR em nosso laboratório, repousa nesta técnica a melhor opção para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo hMPV. A tendência esperada é que conforme a relevância deste patógeno seja mais bem elucidada desperte-se o interesse no desenvolvimento de kits comerciais.

Durante estes anos de estudo laboratorial de amostras coletadas de pacientes adultos com suspeita de infecção por vírus respiratórios buscamos o entendimento do papel das diversas metodologias – clássicas e moleculares – no diagnóstico virológico em pesquisa e assistência aos pacientes.

Em nossa realidade atual, a IF seria mantida como técnica de escolha para elucidação de caso de infecção viral respiratória, considerando os resultados obtidos para Influenza. Contudo, diante dos resultados descritos para Metapneumovírus humano e, principalmente, para Adenovírus recomendamos a aplicação de testes moleculares na rotina diagnóstica laboratorial.

Ressaltando a possibilidade da obtenção do resultado de forma mais rápida. Desde que a amostra seja recebida pelo laboratório em horário de funcionamento normal o resultado pode estar pronto em 1-2 horas. Em contrapartida, a IFD apresenta uma grande limitação por se tratar de uma técnica essencialmente manual, com o manejo de um exame por vez e difícil automação. Essa questão representa a grande vantagem das reações de amplificação dos genes virais, como a RT-PCR, pois permite a realização de maior número de amostras por vez, permitindo um resultado de maior número

de testes por tempo de trabalho, além das recentes implementações de sistemas automação, tornando-os mais reprodutíveis e compatíveis com as rotinas laboratoriais necessárias hoje em dia.

7. Conclusões:

O limite de detecção de cepas controles de influenza não variou sensivelmente entre as metodologias avaliadas, exceto para os testes rápidos.

A concordância entre IF, RT-PCR e isolamento viral para Influenza A e B em adultos com infecção respiratória aguda foi boa, com desempenho da IF discretamente melhor que as demais técnicas.

A IF para a detecção de Metapneumovírus humano obteve baixa sensibilidade e para a detecção de Adenovirus foi inadequada na investigação laboratorial de infecções respiratórias em adultos.

8. BIBLIOGRAFIA:

Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol.* 2001, 39(2):498-505.

Anderson LJ, Patriarca PA, Hierholzer JC, Noble GR. Viral respiratory illnesses. *Med Clin North Am.* 1983, 67(5):1009-1030.

Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol.* 2006, 78(9):1232-1240.

Atmar RL, Baxter BD, Dominguez EA, Taber LH. Comparison of reverse transcription-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza virus. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34(10), 2604-2606.

Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, Troutt T. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *J Clin Microbiol.* 2000, 38(8):2824-2828.

Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, Lochindarat S, Nguyen TK, Nguyen TH, Tran TH, Nicoll A, Touch S, Yuen KY;. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med.* 2005, 353(13):1374-1385.

Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, Pozzetto B, Ginevra C, Freymuth F. Development of three

multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods*. 2005, 126(1-2):53-63.

Bellei N, Carraro E, Perosa A, Granato C. Patterns of influenza infections among different risk groups in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2007a, 11(4):399-402.

Bellei N, Carraro E, Perosa AH, Benfica D, Granato CF. Influenza and rhinovirus infections among health-care workers. *Respirology*. 2007b, 12(1):100-103.

Belshe RB. Influenza prevention and treatment: current practices and new horizons. *Ann Intern Med*. 1999, 131(8):621-4.

Bertino JS. Cost burden of viral respiratory infections: issues for formulary decision makers. *Am J Med*. 2002, 112(Suppl 6A):42S-49S.

Bisno AL. Acute pharyngitis. *N Engl J Med*. 2001, 344(3):205-11.

Blanke C, Clark C, Broun ER, Tricot G, Cunningham I, Cornetta K, Hedderman A, Hromas R. Evolving pathogens in allogeneic bone marrow transplantation: increased fatal adenoviral infections. *Am. J. Med.*, 1995, 99:326-328.

Boivin G, Hardy I, Kress A, Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLU OIA test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol*. 2001, 39(2), 730-732.

Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, Peret TC, Erdman DD, Anderson LJ. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis*. 2002, 186(9):1330-1334.

Burik JA. Human metapneumovirus: important but not currently diagnosable. *Ann Intern Med.* 2006, 144(5):374-375.

Carman WF, Wallace LA, Walker J, McIntyre S, Noone A, Christie P, Millar J, Douglas JD. Rapid virological surveillance of community influenza infection in general practice. *BMJ.* 2000, 321(7263):736-737.

Carrigan DR. Adenovirus infections in immunocompromised patients. *Am J Med.* 1997, 102(3A):71-74.

Casiano-Colon AE, Hulbert BB, Mayer TK, Walsh EE, Falsey AR. Lack of sensitivity of rapid antigen tests for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults. *J Clin Virol.* 2003, 28(2):169-174.

Cazacu AC, Demmler GJ, Neuman MA, Forbes BA, Chung S, Greer J, Alvarez AE, Williams R, Bartholoma NY. Comparison of a new lateral-flow chromatographic membrane immunoassay to viral culture for rapid detection and differentiation of influenza A and B viruses in respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 2004, 42(8):3661-3664.

Chaharaein B, Omar AR, Aini I, Yusoff K, Hassan SS. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay for rapid detection of avian influenza virus subtype H9N2. *Arch Virol.* 2006, 151(12):2447-2459.

Chan KH, Lam SY, Puthavathana P, Nguyen TD, Long HT, Pang CM, Chan KM, Cheung CY, Seto WH, Peiris JS. Comparative analytical sensitivities of six rapid influenza A antigen detection test kits for detection of influenza A subtypes H1N1, H3N2 and H5N1. *J Clin Virol.* 2007, 38(2):169-171.

Cherian T, Bobo L, Steinhoff MC, Karron RA, Yolken RH. Use of PCR-enzyme immunoassay for identification of influenza A virus matrix RNA in clinical samples negative for cultivable virus. *J Clin Microbiol.* 1994, 32(3),623-628.

Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Evaluation of a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for subtyping hemagglutinin genes 1 and 3 of swine influenza type A virus in clinical samples. *J Vet Diagn Invest.* 2002, 14(1):62-65.

Chung JY, Han TH, Kim SW, Hwang ES. Respiratory picornavirus infections in Korean children with lower respiratory tract infections. *Scand J Infect Dis.* 2007, 39(3):250-254.

Clementi M, Menzo S, Bagnarelli P, Manzin A, Valenza A, Varaldo PE. Quantitative PCR and RT-PCR in virology. *PCR Methods Appl.* 1993, 2:191-196.

CLSI. Viral culture; Approved guideline. CLSI document M41-A. 2006, 26(35):1-63.

Cooper, L.A., Subbarao, K., 2000. A simple restriction fragment length polymorphism-based strategy that can distinguish the internal genes of human H1N1, H3N2, and H5N1 influenza A viruses. *J. Clin. Microbiol.* 38(7):2579-2583.

Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet.* 1999, 354(9186):1277-1282.

Daum LT, Canas LC, Schadler CA, Ujimori VA, Huff WB, Barnes WJ, Lohman KL. A rapid, single-step multiplex reverse transcription-PCR assay for

the detection of human H1N1, H3N2, and B influenza viruses. *J. Clin. Virol.* 2002, 25(3):345-350.

Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol.* 2004, 42(1):79-82.

Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent-antibody test. *J Clin Microbiol.* 2005, 43(3):1138-1141.

Enders JF, Weller TH, Robbins FC. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* 1949, 109:85-87.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006, 19(1):165-256.

Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis.* 2003, 187(5):785-90.

Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Semin Respir Crit Care Med.* 2007, 28(2):171-181.

Fedorko DP, Nelson NA, McAuliffe JM, Subbarao K. Performance of rapid tests for detection of avian influenza A virus types H5N1 and H9N2. *J Clin Microbiol.* 2006, 44(4):1596-1597.

Fiore AE, Shay DK, Haber P, Iskander JK, Uyeki TM, Mootrey G, Bresee JS, Cox NJ; Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2007. *MMWR Recomm Rep.* 2007, 56(RR-6):1-54.

Flomenberg, P.; Babbit, J.; Drobyski, W.R.; et al. Increasing incidence of adenoviral disease in bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 1994, 169:475-481.

Fong CK, Lee MK, Griffith BP. Evaluation of R-Mix FreshCells in shell vials for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol.* 2000, 38(12):4660-4662.

Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus AD. Newer respiratory virus infections: human metapneumovirus, avian influenza virus, and human coronaviruses. *Curr Opin Infect Dis.* 2005, 18(2):141-146.

Freythuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, Gouarin S, Petitjean J, Eckart P, Brouard J. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol.* 2006, 78(11):1498-1504.

Fujimoto T, Okafuji T, Okafuji T, Ito M, Nukuzuma S, Chikahira M, Nishio O. Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2004, 42(12):5489-5492.

Gavin PJ; Thomson RB. Review of rapid diagnostic tests for influenza. *Clin Appl Immunol Rev.* 2003, 4:151-172.

George, K.S.; Patel, N.M.; Hartwing, R.A.; Scholl, D.R.; Jollick Jr, J.A.; Kauffmann, L.M.; Evans, M.R.; Rinaldo Jr, C.R. Rapid and sensitive detection of respiratory virus infections for directed antiviral treatment using R-mix cultures. *J. Clin. Virol.*, 2002, 24:107-115.

Gerna G, Sarasini A, Percivalle E, Campanini G, Rovida F, Marchi A, Baldanti F. Prospective study of human metapneumovirus infection: Diagnosis, typing and virus quantification in nasopharyngeal secretions from pediatric patients. *J Clin Virol.* 2007, 40(3):236-240.

Gleaves CA, Smith TF, Shuster FA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol.* 1984, 19(6):917–919.

Gleaves CA, Wilson DJ, Wold AD, Smith TF. Detection and serotyping of herpes simplex virus in MRC-5 cells by use of centrifugation and monoclonal antibodies 16 h postinoculation. *J Clin Microbiol.* 1985, 21(1):29-32.

Goodgame RW. Viral infections of the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep.* 1999, 1(4):292-300.

Greenberg SB. Respiratory viral infections in adults. *Curr Opin Pulm Med.* 2002, 8(3):201-208.

Grondahl B, Puppe W, Weigl J, Schmitt HJ. Comparison of the BD Directigen Flu A+B Kit and the Abbott TestPack RSV with a multiplex RT-PCR

ELISA for rapid detection of influenza viruses and respiratory syncytial virus. *Clin Microbiol Infect.* 2005, 11(10):848-850.

Habib-Bein NF, Beckwith WH 3rd, Mayo D, Landry ML. Comparison of SmartCycler real-time reverse transcription-PCR assay in a public health laboratory with direct immunofluorescence and cell culture assays in a medical center for detection of influenza A virus. *J Clin Microbiol.* 2003, 41(8):3597-3601.

Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM. Respiratory syncytial virus infections in infants: quantitation and duration of shedding. *J Pediatr.* 1976, 89(1):11-5.

Halonen P, Herholzer J, Ziegler T. Advances in the diagnosis of respiratory virus infections. *Clin Diagn Virol.* 1996, 5(2-3):91-100.

Hayden, FG. Antivirals for influenza: historical perspectives and lessons learned. *Antiviral Res.* 2006, 71(2-3):372-378.

Heikkinen T, Chonmaitree T. Increasing importance of viruses in acute otitis media. *Ann Med.* 2000, 32(3):157-163.

Herrmann B, Larsson C, Zwegberg BW. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39(1):134-138.

Hierholzer JC. Rapid diagnosis of viral infection. In: Vaheri A, Tilton RC, Balows A (Eds.). *Rapid method and automation in microbiology and immunology.* Springer-Verlag. Berlin, 1991, pp.556-573.

Hierholzer, JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev.* 1992, 5(3):262-274.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991, 88(16):7276-7280.

Howard, D.S.; Phillips, G.L.; Reece, D.E.; Munn, R.K.; Henslee-Downey, J.; Pittard, M.; Barker, M.; Pomeroy, C. Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 1999, 29:1494-1501.

Huck B, Neumann-Haefelin D, Schmitt-Graeff A, Weckmann M, Mattes J, Ehl S, Falcone V. Human metapneumovirus induces more severe disease and stronger innate immune response in BALB/c mice as compared with respiratory syncytial virus. *Respir Res.* 2007, 8:6.

Ison MG, Mills J, Openshaw P, Zambon M, Osterhaus A, Hayden F. Current research on respiratory viral infections: Fourth International Symposium. *Antiviral Res.* 2002, 55(2):227-278.

Jacques J, Bouscambert-Duchamp M, Moret H, Carquin J, Brodard V, Lina B, Motte J, Andreoletti L. Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. *J Clin Virol.* 2006, 35(4):463-466.

Jain N, Lodha R, Kabra SK. Upper respiratory tract infections. *Indian J Pediatr.* 2001, 68(12):1135-1138.

Jansen AG, Sanders EA, Hoes AW, van Loon AM, Hak E. Influenza- and respiratory syncytial virus-associated mortality and hospitalisations. *Eur Respir J.* 2007, em processo de citação.

Kaiser L, Couch RB, Galasso GJ, Glezen WP, Webster RG, Wright PF, Hayden FG. First International Symposium on Influenza and Other Respiratory Viruses: summary and overview: Kapalua, Maui, Hawaii, December 4-6, 1998. *Antiviral Res.* 1999a, 42(3):149-175.

Kaiser L, Briones MS, Hayden FG. Performance of virus isolation and Directigen Flu A to detect influenza A virus in experimental human infection. *J Clin Virol.* 1999b, 14(3):191-197.

Keller GH, Huang DP, Shih JW, Manak MM. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microtiter sandwich hybridization. *J Clin Microbiol.* 1990, 28(6):1411-1416.

Kikuta H, Ebihara T, Endo R, Ishiguro N, Sakata C, Ochiai S, Ishiko H, Gamo R, Sato T. Development of a rapid chromatographic immunoassay for detection of human metapneumovirus using monoclonal antibodies against nucleoprotein of hMPV. *Hybridoma.* 2007, 26(1):17-21.

Kim HW, Wyatt RG, Fernie BF, Brandt CD, Arrobio JO, Jeffries BC, Parrott RH. Respiratory syncytial virus detection by immunofluorescence in nasal secretions with monoclonal antibodies against selected surface and internal proteins. *J Clin Microbiol.* 1983, 18(6):1399–1404.

Klapper PE, Jungkind DL, Fenner T, Antinozzi R, Schirm J, Blanckmeister C. Multicenter international work flow study of an automated polymerase chain reaction instrument. *Clin Chem.* 1998, 44:1737-1739.

Koetz A, Nilsson P, Lindén M, van der Hoek L, Ripa T. Detection of human coronavirus NL63, human metapneumovirus and respiratory syncytial

virus in children with respiratory tract infections in south-west Sweden. *Clin Microbiol Infect.* 2006, 12(11):1089-1096.

Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol.* 2003, 13(3):155-171.

Kuiken T, van den Hoogen BG, van Riel DA, Laman JD, van Amerongen G, Sprong L, Fouchier RA, Osterhaus AD. Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract. *Am J Pathol.* 2004, 164(6):1893-1900.

Kuypers J, Wright N, Corey L, Morrow R. Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real-time RT-PCR. *J Clin Virol.* 2005, 33(4):299-305.

Landry ML, Ferguson D. SimulFluor respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining. *J Clin Microbiol.* 2000, 38(2):708-711.

Landry ML, Ferguson D. Suboptimal detection of influenza virus in adults by the Directigen Flu A+B enzyme immunoassay and correlation of results with the number of antigen-positive cells detected by cytospin immunofluorescence. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41(7):3407-3409.

Landry ML, Ferguson D, Cohen S, Peret TC, Erdman DD. Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of

shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines. *J Clin Microbiol.* 2005, 43(4):1950-1952.

Larranaga C, Martinez H J, Palomino M A, Pena C M, Carrion A F, Avendano C LF. Molecular characterization of hospital-acquired adenovirus infantile respiratory infection in Chile using species-specific PCR assays. *J Clin Virol.* 2007, 39(3):175-181.

LaSala PR, Bufton KK, Ismail N, Smith MB. Prospective comparison of R-mix shell vial system with direct antigen tests and conventional cell culture for respiratory virus detection. *J Clin Virol.* 2007, 38(3):210-216.

Lee SH, Boutilier JE, MacDonald MA, Forward KR. Enhanced detection of respiratory viruses using the shell vial technique and monoclonal antibodies. *J Virol Methods.* 1992, 39(1-2):39-46.

Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21(16):3761-3766.

Lee I, Barton TD. Viral respiratory tract infections in transplant patients: epidemiology, recognition and management. *Drugs.* 2007, 67(10):1411-14127.

Leland DS, Ginocchio CC. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clin Microbiol Rev.* 2007, 20(1):49-78.

Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S. Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39(8):2779-2783.

Mackie PL. The classification of viruses infecting the respiratory tract. *Paediatr Respir Rev.* 2003, 4(2):84-90.

Madeley CR, Peiris JS. Methods in virus diagnosis: immunofluorescence revisited. *J Clin Virol.* 2002, 25(2):121-134.

McQuillin J, Gardner PS. Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection by immunofluorescent antibody techniques. *Br Med J.* 1968, 9;1(5592):602-605.

Molinari NA, Ortega-Sanchez IR, Messonnier ML, Thompson WW, Wortley PM, Weintraub E, Bridges CB. The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. *Vaccine.* 2007, 25(27):5086-5096.

Monto AS. Viral respiratory infections in the community: epidemiology, agents, and interventions. *Am J Med.* 1995, 99(6B):24S-27S.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987, 155:335-350.

Munch M, Nielsen LP, Handberg KJ, Jorgensen PH. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol.* 2001, 146(1):87-97.

Munoz FM, Galasso GJ, Gwaltney JM Jr, Hayden FG, Murphy B, Webster R, Wright P, Couch RB. Current research on influenza and other respiratory viruses: II international symposium. *Antiviral Res.* 2000, 46(2):91-124.

Navarro-Mari JM, Sanbonmatsu-Gamez S, Perez-Ruiz M, De La Rosa-Fraile M. Rapid detection of respiratory viruses by shell vial assay using

simultaneous culture of HEp-2, LLC-MK2, and MDCK cells in a single vial. J Clin Microbiol. 1999, 37(7):2346-2347.

Ou CY, Kwok S, Mitchel SW, Mack DH, Sninsky JJ, Krebs JW, Feorino P, Warfield D, Schoecketman G. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear *cells*. Science, 1988, 239:295-297.

Percivalle E, Sarasini A, Visai L, Revello MG, Gerna G. Rapid detection of human metapneumovirus strains in nasopharyngeal aspirates and shell vial cultures by monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 2005, 43(7):3443-3446.

Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the Laboratory in Diagnosis of Influenza during Seasonal Epidemics and Potential Pandemics. J Infect Dis. 2006, 194(Suppl 2):S98-S110.

Poddar, S.K. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. J. Virol. Methods. 2002, 99(1-2):63-70.

Poddar SK. Detection of type and subtypes of influenza virus by hybrid formation of FRET probe with amplified target DNA and melting temperature analysis. J Virol Methods. 2003, 108(2):157-163.

Raty, R.; Kleemola, M.; Melén, K.; Stenvik, M.; Julkunen, I. Efficacy of PCR and other diagnostic methods for the detection of respiratory adenoviral infections. J. Med. Virol. 1999, 59:66-72.

Rebelo-de-Andrade H, Zambon MC. Different diagnostic methods for detection of influenza epidemics. Epidemiol Infect. 2000, 124(3):515-522.

Reina J, Ferres F, Alcoceba E, Mena A, de Gopegui ER, Figuerola J. Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by the

shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples. *J Clin Virol.* 2007, 40(1):46-49.

Rivers TM, Ward SM. Jennerian prophylaxis by means of intradermal injections of culture vaccine virus. *J Exp Med.* 1935, 62:549-560.

Ruest A, Michaud S, Deslandes S, Frost EH. Comparison of the Directigen flu A+B test, the QuickVue influenza test, and clinical case definition to viral culture and reverse transcription-PCR for rapid diagnosis of influenza virus infection. *J Clin Microbiol.* 2003, 41(8):3487-3493.

Salgado CD, Farr BM, Hall KK, Hayden FG. Influenza in the acute hospital setting. *Lancet Infect Dis.* 2002, 2(3):145-155.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230(4732):1350-1354.

Schmidt, A.C.; Couch, R.B.; Galasso, G.J.; Hayden, F.G.; Mills, J.; Murphy, R.B.; Chanock, .M. Current research on respiratory viral infections: third international symposium. *Antiv. Res.* 2001, 50:157-196.

Schweiger B, Zadow I, Heckler R, Timm H, Pauli G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J Clin Microbiol.* 2000, 38(4):1552-1558.

Secretaria de Vigilância em Saúde. O desafio da influenza: Epidemiologia e organização da Vigilância no Brasil. *Boletim Eletrônico Epidemiológico.* 2004, 4(1):1-7.

Shetty AK, Treynor E, Hill DW, Gutierrez KM, Warford A, Baron EJ. Comparison of conventional viral cultures with direct fluorescent antibody stains for diagnosis of community-acquired respiratory virus infections in hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J.* 2003, 22(9):789-794.

Shih SR, Tsao KC, Ning HC, Huang YC, Lin TY. Diagnosis of respiratory tract viruses in 24 h by immunofluorescent staining of shell vial cultures containing Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells. *J Virol Methods.* 1999, 81(1-2):77-81.

Stamboulian D, Bonvehi PE, Nacinovich FM, Cox N. Influenza. *Infect Dis Clin North Am.* 2000, 14(1):141-166.

Stein J, Louie J, Flanders S, Maselli J, Hacker JK, Drew WL, Gonzales R. Performance characteristics of clinical diagnosis, a clinical decision rule, and a rapid influenza test in the detection of influenza infection in a community sample of adults. *Ann Emerg Med.* 2005, 46(5):412-419.

Steininger C, Kundi M, Aberle SW, Aberle JH, Popow-Kraupp T. Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40(6): 2051-2056.

Stephenson I, Zambon M. The epidemiology of influenza. *Occup Med (Lond).* 2002, 52(5):241-247.

Stinehardt E, Israeli C, Lambert R. Studies on the cultivation of the virus of the vaccinia. *J Infect Dis.* 1913, 13:204-300.

Stone B, Burrows J, Schepetiuk S, Higgins G, Hampson A, Shaw R, Kok T. Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR. *J. Virol. Methods* 2004, 117(2):103-112.

Stout C, Murphy MD, Lawrence S, Julian S. Evaluation of a monoclonal antibody pool for rapid diagnosis of respiratory viral infections. *J Clin Microbiol.* 1989, 27(3):448-452.

Templeton KE, Forde CB, Loon AM, Claas EC, Niesters HG, Wallace P, Carman WF. A multi-centre pilot proficiency programme to assess the quality of molecular detection of respiratory viruses. *J Clin Virol.* 2006, 35(1):51-58.

van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 2001, 7(6):719-724.

van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2004, 23(1 Suppl):S25-S32.

Wallace LA, McAulay KA, Douglas JD, Elder AG, Stott DJ, Carman WF. Influenza diagnosis: from dark isolation into the molecular light. West of Scotland Respiratory Virus Study Group. *J. Infect.* 1999, 39(3):221-226.

Walls T, Shankar AG, Shingadia D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis.* 2003, 3(2):79-86.

Waris M, Ziegler T, Kivivirta M, Ruuskanen O. Rapid detection of respiratory syncytial virus and influenza A virus in cell cultures by

immunoperoxidase staining with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1990, 28(6):1159–1162.

Wei SC, Norwood J. Diagnosis and management of respiratory tract infections for the primary care physician. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2001, 28(2):283-304.

Weinberg A, Brewster L, Clark J, Simoes E; ARIVAC consortium. Evaluation of R-Mix shell vials for the diagnosis of viral respiratory tract infections. *J Clin Virol.* 2004, 30(1):100-105.

Weinberg A, Walker ML. Evaluation of three immunoassay kits for rapid detection of influenza virus A and B. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005, 12(3):367-370.

Woo PC, Chiu SS, Seto WH, Peiris M. Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in pediatric patients. *J Clin Microbiol.* 1997, 35(6):1579-1581.

Wright PF; Webster RG. Orthomyxoviruses. In *Fields Virology*. Lippincott-Raven; 2001.

Wood SR, Sharp IR, Caul EO, Paul I, Bailey AS, Hawkins M, Pugh S, Treharne J, Stevenson S. Rapid detection and serotyping of adenovirus by direct immunofluorescence. *J Med Virol.* 1997, 51(3):198-201.

Yamazaki M, Kimura K, Mitamura K, Watanabe S, Komiyama O, Yamamoto K, Ichikawa M, Hashimoto Y, Hagiwara N, Maezawa T, Imai M, Sugaya N. Clinical evaluation of rapid diagnostic kit detecting separately influenza A and B viruses. *Kansenshogaku Zasshi.* 2000, 74(12):1032-1037.

Yang E, Rubin BK. "Childhood" viruses as a cause of pneumonia in adults. *Semin Respir Infect.* 1995, 10(4):232-243.

Ziegler T, Hall H, Sánchez-Fauquier A, Gamble WC, Cox NJ. Type- and subtype-specific detection of influenza viruses in clinical specimens by rapid culture assay. *J Clin Microbiol.* 1995, 33(2): 318–321.

ANEXO 1: questionário clínico e epidemiológico aplicado aos pacientes.

FICHA PROTOCOLO INVESTIGAÇÃO SÍNDROME GRIPAL

Origem

Número Paciente Data coleta

Idade Sexo

Contato c/ Cça < 5 anos sim não

Início dos sintomas:

Febre sim não

Sintomas respiratórios tosse coriza/obstr dor garg

Sintomas gerais cefaléia mialgia calafrios

Doenças de base

cardiopatia sim não

pulmonar sim não

diabetes sim não

hipertensão sim não

tabagismo sim não

outros ?

Vacina p/ influenza sim não

Local de trabalho:

Tempo de transplante:

ANEXO 2: Aprovação do estudo no Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 19 de setembro de 2003
CEP 0948/03

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) EMERSON CARRARO
Disciplina/Departamento: Doenças Infecciosas e Parasitárias/Medicina da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Dinâmica da circulação de adenovírus associado a síndrome respiratória em populações distintas da cidade de São Paulo utilizando técnicas moleculares"**.

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **18/setembro/2004**.
5. Apresentar segundo relatório parcial em **18/setembro/2005**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."



Applications of a duplex reverse transcription polymerase chain reaction and direct immunofluorescence assay in comparison with virus isolation for detection of influenza A and B

Emerson Carraro, Daniel Ferreira Neto, Daniela Benfica, Ana Helena Sitta Perosa, Celso Francisco Hernandez Granato, Nancy Cristina Junqueira Bellei*

Clinical Virology Laboratory, Infectious Diseases Unit, Medicine Department, São Paulo Federal University, Rua Pedro de Toledo, CEP: 04039-032, São Paulo, SP, Brazil

Received 7 June 2006; accepted 9 November 2006

Abstract

A duplex reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and direct immunofluorescence assays (DFAs) were evaluated for detection of influenza types A and B in comparison with virus isolation in Madin–Darbin canine kidney cells. Four hundred four nasal wash were collected from individuals presenting with acute respiratory symptoms during 2001 to 2003 influenza seasons. According to the reference method, 78 (19.3%) samples were infected by influenza virus: 46 were type A and 32 type B. The overall concordance between the 3 assays was 96%, with 317 negative and 71 positive samples in all tests. RT-PCR reached 92.3% sensitivity and 98.5% specificity, and for DFA, the corresponding values were 93.6% and 97.2%, respectively. DFA and RT-PCR could be applied in different routine settings, resulting as an advantage compared with virus isolation: DFA provides rapid results for clinical purposes, but RT-PCR allows running more samples, an important concern in early pandemic circumstances.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Influenza; RT-PCR; Direct immunofluorescent assay; Virus isolation

1. Introduction

Influenza virus infections are an important cause of respiratory disease worldwide. The period of influenza virus circulation is associated with increased consultation with medical practitioners, hospitalizations, and excess deaths (Webster, 1998). In addition to prevention by vaccination, influenza can now be managed with specific antiviral drugs. However, as that therapeutic approach is only successful in the 1st days of infection, a rapid diagnostic test is desirable (Hayden et al., 1999).

Among the factors to consider in the decision to introduce a rapid diagnostic test in the clinical laboratory, sensitivity and turnaround time are always taken into account. Sensitivity is dependent on the specimen type, age (children or adult), immune status, and location

(hospital or outpatient) of the population to be tested (Gavin and Thomson, 2004).

The gold standard for virus detection is isolation in cell culture; however, it is not 100% sensitive and does not provide results in a time frame that allows for optimal use of potentially effective antiviral treatment. Detection of virus-infected cells in clinical specimens by direct immunofluorescent staining is widely used but involves subjective differentiation of fluorescence from nonspecific or background staining (Madeley and Peiris, 2002). Recently, a variety of promising molecular-based techniques have been developed, but because of the high genetic variability of influenza viruses, it still remains a challenge for virology laboratories (Gavin and Thomson, 2004).

The objective of this study is to evaluate the diagnostic performances of a duplex reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and a direct immunofluorescence assay (DFA) in comparison with influenza A and B virus isolation.

* Corresponding author. Tel.: +55-11-50815394; fax: +55-11-50815394.

E-mail address: nbellei@uol.com.br (N.C.J. Bellei).

2. Materials and methods

2.1. Clinical specimens

Nasal wash (NW) specimens were collected from individuals presenting with acute respiratory symptoms referred by physicians from São Paulo Hospital to the Clinical Virology Laboratory (CVL), São Paulo, Brazil. All samples used for this study were collected by a well-trained laboratory staff during routine investigation of acute respiratory tract infection. NWs were obtained after Ringer lactate instillation (2.5 mL each nostril) and expectoration into a collection device. Each sample must contain at least 3 to 5 mL of final volume. NWs were kept at 4 °C and transported immediately to CVL. Upon receipt of the specimen, an aliquot (1 mL) was taken in a type II biologic safety cabinet for molecular analysis, another aliquot (1 mL) was added to equal volume of viral transport media, and both were stored at –70 °C until it was tested for viral isolation and RT-PCR. The remaining specimen volume was evaluated on the same day by direct fluorescent assay.

2.2. Direct fluorescent assay

To remove mucus from NW, we added 5 mL of 2% solution of *N*-acetylcysteine to the specimens, and the whole volume was pipetted up and down. Samples were then centrifuged at $700 \times g$ for 5 min to obtain pelleted cells for DFA. The pellets were resuspended in a small volume of phosphate-buffered saline (PBS), and approximately 50 μ L of the suspension was applied per cell spot. Slides were air dried and then fixed in cold acetone for 10 min. Cell spots were stained with 40 μ L of Simulfluor Respiratory Screen reagent (Chemicon International, Temecula, CA) for 30 min at 37 °C. After a 2-min wash in PBS, the slides were mounted in glycerol and examined for the presence of rhodamine-labeled cells for detection of RSV and/or fluorescein-labeled cells for detection of other respiratory viruses. When fluorescein-positive cells were detected, a 2nd slide with 6 cell spots was prepared for reactive samples. Each cell spot was separately stained with influenza A and B, adenovirus, and parainfluenza virus types 1, 2, and 3 DFA reagents (Chemicon International) in the same way as described hereinabove for the 1st slide. A positive result was indicated by the presence of at least 1 intact cell exhibiting specific fluorescence. A negative result was indicated by the absence of fluorescence in a minimum sampling of 20 ciliated epithelial cells. Samples containing fewer than 20 ciliated epithelial cells were considered inadequate.

2.3. Virus isolation

Madin–Darbin canine kidney (MDCK) (CCL-34, ATCC) cell monolayers in roller tubes were maintained in an RPMI (Gibco, Grand Island, NY) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, MO), 100 μ g of streptomycin and 100 U of penicillin (Gibco) per milliliters, and 121.5 U of amphotericin B (Gibco) per milliliters in a

35 °C and 5% CO₂ incubator. Patient samples were vortexed for 30 s, and 200 μ L were used to inoculate MDCK cells. Inoculated cells were maintained in RPMI supplemented with 2 μ g of trypsin (Gibco) per milliliters and were incubated at 35 °C and 5% CO₂. Cell cultures were observed for cytopathic effects (CPE) daily for 14 days. Influenza A and B DFA (Chemicon International) confirmation was performed with samples suspected of having a CPE. If no CPE was observed, DFA detection was performed at the end of the incubation period.

2.4. RNA extraction

Viral genomic RNA was extracted from patient samples by using a QIAamp Viral RNA extraction kit (Qiagen, Valencia, CA), according to the instructions of the manufacturer. Clinical samples were homogenized by vortexing for 30 s, and 140 μ L of the samples were used for the extraction of viral genomic RNA. The RNA was eluted from the columns with 60 μ L of elution buffer. The RNA was immediately stored at –70 °C.

2.5. Duplex RT-PCR

The primers used in this study for detection of influenza A were previously reported by Cooper and Subbarao (2000) for amplification of a segment of the influenza M-protein gene (nucleotide positions 149 and 847). The sequences of the influenza A-specific forward and reverse primers are as follows: MF, 5'-CTCATGGAATGGCTAAAGACA-3'; MR, 5'-CGATCAAG/TAAT-CCACAATATC-3'. The primers used for detection of influenza B were described by Poddar (2002) for the amplification part of the influenza NS gene (nucleotide position 37 and 145). The sequences of the influenza B-specific forward and reverse primers are as follows: NSF, 5'-ACAAATTGAGGTGGGTCCG-3'; NSR, 5'-GGCAAGTGCACCAGCAGAAT-AACT-3'. Duplex RT-PCR was performed by adding 3 μ L of extracted RNA to a mixture containing 1.5 mmol/ μ L each of the deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) deoxyadenosine triphosphate, deoxycytidine triphosphate, and deoxyguanosine triphosphate, and 10 mmol/ μ L of the deoxythymidine triphosphate, 10 μ L of 10 \times polymerase chain reaction (PCR) buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 7 μ L of water, and 1 μ L each of forward primer (MF and NSF) at a concentration of 0.5 μ g/ μ L. One hundred units of M-MLV reverse transcription (Invitrogen) and 10 U of RNase inhibitor (Invitrogen) were then added, and the mixture was incubated at 42 °C for 60 min. Subsequent PCR amplification of complementary DNA was accomplished in the same tube through the addition of a 2nd mixture containing an additional 1 mmol/ μ L dNTPs, 5U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 1 μ L each of the reverse primer (MR and NSR) at a concentration of 0.5 μ g/ μ L, and enough water to give a final reaction mixture of 50 μ L. The optimized profile in the thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA) was an initial step of 94 °C for 1 min, followed by 35 cycles from denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 50 °C for 30 s, and synthesis at

72 °C for 1 min. Amplification was completed with prolonged synthesis at 72 °C for 7 min. Positive controls (Influenza A/NewCaledonia/20/99 H1N1, Influenza A/Panama/2007/99 H3N2, and Influenza B/HongKong/33/01) and negative control (water for resuspension of the samples) were included in each series. Amplicons were visualized by ethidium bromide staining after electrophoresis on a 2% agarose gel. The 2 amplicons of influenza A and B were easily distinguished by their molecular weights of 698 and 108 bp, respectively.

2.6. Sensitivity of RT-PCR

A 10-fold stock control (Influenza A H1N1, H3N2, and B) dilution series was prepared to assess the analytical sensitivity of the duplex RT-PCR. Serial dilutions (10^{-1} to 10^{-10}) of controls were tested in duplicate by isolation in MDCK cells and RT-PCR. The last dilution detected in cell culture was considered 1 TCID₅₀ for comparison with RT-PCR.

2.7. Statistical analyses

We compared the performances of the RT-PCR and DFA for the diagnosis of influenza by using viral culture as a gold standard. We calculated the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values from the 2-by-2 contingency tables for each test.

3. Results

3.1. Patients

In the period of the study (June 2001 to September 2003), 404 outpatients assisted at São Paulo Hospital were included. Patients were aged 18 to 83 years (mean, 34 years), with 252 females and 152 males. Samples were collected between 1 and 21 days after onset of symptoms (mean, 3 days), with 83.7% of samples taken within 5 days.

3.2. Duplex RT-PCR limit of detection

Stock virus diluted up to 10^{-8} was detectable for the subtype influenza type A-specific matrix protein gene in RT-PCR and 10^{-7} in cell culture. The sensitivity of detection was equal to 0.1 TCID₅₀ for both influenza A H3N2 and H1N1 subtypes. The influenza B reaction

Table 1
Comparison of RT-PCR, DFA, and virus isolation for detection of influenza A and B in 404 NPWs

Virus isolation	DFA	RT-PCR	No. (%) with given result
+	+	+	71 (17.5)
+	+	–	2 (0.5)
+	–	+	1 (0.25)
+	–	–	4 (1.0)
–	+	+	5 (1.25)
–	+	–	4 (1.0)
–	–	+	0
–	–	–	317 (78.5)

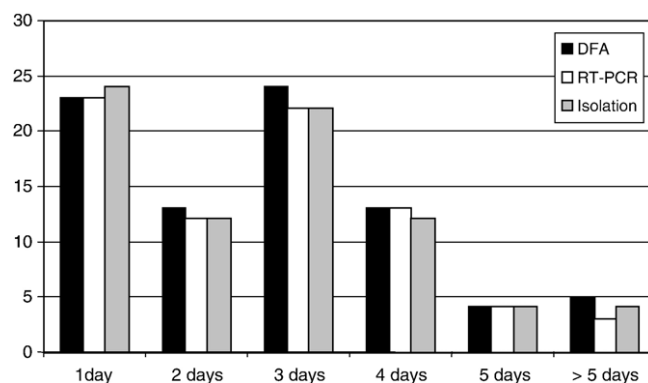


Fig. 1. Influenza detection by different assay according to the days after onset symptoms.

conditions detected 10^{-5} dilutions of stock virus, resulting in sensitivity equal to 1 TCID₅₀.

3.3. Comparative results

Of the 404 specimens tested, 71 were positive and 317 negative for influenza by all 3 assays, resulting in a 96% overall concordance. Detection rates achieved by DFA, virus isolation, and RT-PCR were 20.3% (82 samples), 19.3% (78), and 19.1% (77), respectively.

Discordant results were obtained in 16 samples. Table 1 shows the comparative results obtained for 3 assays. Nine samples were DFA positive but culture negative, and RT-PCR was positive in 5 of them. In addition, 5 cultures were positive and DFA negative, and only 1 of them was RT-PCR positive. In contrast, no sample was detected exclusively by RT-PCR. For all discordant result, no relation was found considering viral type, time after onset of symptoms (Fig. 1), and month or year of study.

In comparison with virus isolation, the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of RT-PCR were 92.3%, 98.5%, 93.5%, and 98.2%, respectively. For DFA, the corresponding values were 93.6%, 97.2%, 89.0%, and 98.5%, respectively.

4. Discussion

Viral isolation remains an essential tool to obtain viral strains for antigenic characterization and vaccine production. From the wider public health perspective, laboratory isolation and characterization of influenza viruses that are circulating in the community remains the backbone of global surveillance for epidemic influenza and for emergence of novel potentially pandemic strains (Gavin and Thomson, 2004). However, in a pandemic situation, a great number of potentially positive samples are received by a CVL, and the mandatory rapid virus identification could not be reached through culture procedures. Alternative methodologies need to be developed, and in extreme situations, only “in house” assays may be available.

Some studies had compared these 3 methodologies in clinical samples. Our results showed a 96% concordance among the 3 methods used in our study. Habib-Bein et al. (2003) obtained similar sensitivity rates (98.7% and 95.3% to DFA and real-time RT-PCR, respectively) in 238 respiratory specimens.

We optimized viral culture procedures and obtained a good performance when compared with other assays. MDCK cells used for culture were rinsed to remove serum before inoculation, serum-free medium was added to trypsin, and it was incubated on roller drums for 2 weeks. The variables that may interfere in virus isolation were well controlled, because samples were immediately transported and promptly stored (-70°C). When samples have to be transported to a distant site, results would be expected to favor molecular methods, because there is a greater decline in the amount of infectious virus.

Several studies have evaluated RT-PCR for diagnosis of influenza. Various strategies have been described: a single RT-PCR (Atmar et al., 1996; Steininger et al., 2002), duplex RT-PCR for typing (Herrmann et al., 2001; Stone et al., 2004), or multiplex RT-PCR for detection of several viruses simultaneously (Daum et al., 2002). Different methods were applied for amplicons identification, such as agarose gel electrophoresis (Cooper and Subbarao, 2000), microplate hybridization (Liolios et al., 2001), enzyme immunoassay (Cherian et al., 1994), or real-time RT-PCR (Habib-Bein et al., 2003). We optimized and applied a duplex RT-PCR with gel electrophoresis for detection and differentiation of influenza A and B, which was performed easier and with less cost. In our study, RT-PCR showed sensitivity of 92% in 404 specimens from adults with acute respiratory infection. These results have been comparable with those reported in others studies with similar protocols (Atmar et al., 1996; Boivin et al., 2001; Steininger et al., 2002) or real-time protocols (Habib-Bein et al., 2003).

In contrast to other reports, no additional positive samples were detected by RT-PCR. The 10 positive samples (culture and/or DFA) not amplified by PCR could be due to storage procedures before RNA extraction. These results raise concern about the frequency of inhibition and loss of influenza virus RNA either during extraction process or due to the presence of RNase in the samples (Wallace et al., 1999).

Previous studies (Cherian et al., 1994) have demonstrated that RT-PCR is particularly efficient for the identification of influenza virus in comparison with virus isolation in samples obtained more than 4 days after experimental infection. This may be due to concentration decrease of viable viruses in nasopharyngeal secretions after the 1st days of infection. Our specimens were obtained from patients with a median of 3 days after onset of symptoms, probably a very short time for nonprotocol patients. According to this, RT-PCR could be even more advantageous than presented in this study.

DFA results are difficult to compare among laboratories, and each laboratory must determine and continually monitor its own sensitivity and specificity. For the best DFA results, expert staff, centrifugation preparation of slides, highest quality of reagents, dark room, and high-quality fluorescent microscope, with frequent changes of microscope bulb to maintain brightness, are required (Habib-Bein et al., 2003). In our laboratory, all those recommendations are continuously applied, resulting in higher DFA detection. In contrast to other assays, centrifugation performed before DFA staining may have contributed to a significant impact on DFA sensitivity. All 4 positive DFA samples but negative culture and RT-PCR had less than 10 stained cells. Cell concentration (centrifugation) was performed only for DFA techniques. This may explain the negative results for the other tests.

Landry and Ferguson (2003) have already demonstrated assay discordance when fewer cells were positive in DFA. Indeed, we obtained an RT-PCR-positive result among 5 samples that were DFA positive and culture negative. Some authors have suggested molecular amplification of viruses as alternative gold standard in addition to virus isolation (Wallace et al., 1999). According to these findings, our 5 DFA and RT-PCR-positive specimens can be considered as true positives, resulting in 82 of 83 DFA-positive samples, increasing specificity and positive predictive values (98.75% and 95%).

DFA is a rapid test, providing results in 1 h if a small number of samples are receipt throughout the CVL's operating hours. RT-PCR is more advantageous only for running more samples than a limit established for DFA.

In summary, RT-PCR and DFA provide sensitive and specific results for detection of influenza A and B and can be applied in different routine settings. DFA results are more rapid when compared with other methods for clinical purpose. RT-PCR allows for the performance of more samples what may be crucial in the elucidation of outbreaks in early pandemic circumstances (Sintchenko et al., 2002).

Acknowledgments

The authors would like to thank Fleury Laboratory for influenza strains controls. This study was supported by Fundacao de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP number 01/125796).

References

- Atmar RL, Baxter BD, Dominguez EA, Taber LH (1996) Comparison of reverse transcription-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza virus. *J Clin Microbiol* 34:2604–2606.
- Boivin G, Hardy I, Kress A (2001) Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLU OIA test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 39:730–732.

- Cherian T, Bobo L, Steinhoff MC, Karron RA, Yolken RH (1994) Use of PCR-enzyme immunoassay for identification of influenza A virus matrix RNA in clinical samples negative for cultivable virus. *J Clin Microbiol* 32:623–628.
- Cooper LA, Subbarao K (2000) A simple restriction fragment length polymorphism-based strategy that can distinguish the internal genes of human H1N1, H3N2, and H5N1 influenza A viruses. *J Clin Microbiol* 38:2579–2583.
- Daum LT, Canas LC, Schadler CA, Ujimori VA, Huff WB, Barnes WJ, Lohman KL (2002) A rapid, single-step multiplex reverse transcription-PCR assay for the detection of human H1N1, H3N2, and B influenza viruses. *J Clin Virol* 25:345–350.
- Gavin PJ, Thomson RB (2004) Review of rapid diagnostic tests for influenza. *Clin Appl Immunol Rev* 4:151–172.
- Habib-Bein NF, Beckwith III WH, Mayo D, Landry ML (2003) Comparison of SmartCycler real-time reverse transcription-PCR assay in a public health laboratory with direct immunofluorescence and cell culture assays in a medical center for detection of influenza A virus. *J Clin Microbiol* 41:3597–3601.
- Hayden FG, Atmar RL, Schilling M, Johnson C, Poretz D, Paar D, Huson L, Ward P, Mills RG (1999) Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. *N Engl J Med* 341:1336–1343.
- Herrmann B, Larsson C, Zwegyberg BW (2001) Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol* 39:134–138.
- Landry ML, Ferguson D (2003) Suboptimal detection of influenza virus in adults by the Directigen Flu A+B enzyme immunoassay and correlation of results with the number of antigen-positive cells detected by cytospin immunofluorescence. *J Clin* 7:3407–3409.
- Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S (2001) Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR–enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. *J Clin Microbiol* 39:2779–2783.
- Madeley CR, Peiris JS (2002) Methods in virus diagnosis: immunofluorescence revisited. *J Clin Virol* 25:121–134.
- Poddar SK (2002) Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *J Virol Methods* 99:63–70.
- Sintchenko V, Gilbert GL, Coiera E, Dwyer D (2002) Treat or test first? Decision analysis of empirical antiviral treatment of influenza virus infection versus treatment based on rapid test results. *J Clin Virol* 25:15–21.
- Steininger C, Kundi M, Aberle SW, Aberle JH, Popow-Kraupp T (2002) Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. *J Clin Microbiol* 40:2051–2056.
- Stone B, Burrows J, Schepetiuk S, Higgins G, Hampson A, Shaw R, Kok T (2004) Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR. *J Virol Methods* 117:103–112.
- Wallace LA, McAulay KA, Douglas JD, Elder AG, Stott DJ, Carman WF (1999) Influenza diagnosis: from dark isolation into the molecular light. West of Scotland Respiratory Virus Study Group. *J Infect* 39:221–226.
- Webster RG (1998) Influenza: an emerging disease. *Emerg Infect Dis* 4:436–441.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)