

Comparação da Imunofluorescência Direta (IFD) e da Reação em Cadeia da Polimerase na detecção do metapneumovírus humano (hMPV) em pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG)



UFRGS **XXV SIC**
PROPESQ **Salão Iniciação Científica**
CB - Ciências Biológicas

WOLF, J.M.^{1,3} ; IKUTA, N.^{2,3}

¹Acadêmico do Curso de Biomedicina ULBRA

²Docente ULBRA

³Laboratório de Diagnóstico Molecular, Universidade Luterana do Brasil

INTRODUÇÃO

A Infecção Respiratória Aguda (IRA) representa um dos maiores problemas de saúde pública no mundo devido a sua ampla distribuição, facilidade de disseminação na comunidade e elevada morbidade e mortalidade, especialmente entre pacientes pediátricos.⁽¹⁾ Diversos estudos têm demonstrado que o hMPV é responsável por uma elevada proporção de casos de IRA do trato respiratório inferior em crianças com idade abaixo de 5 anos. A incidência estimada varia entre 5 e 15%, porém taxas mais altas já foram relatadas.⁽⁵⁾ O hMPV é um vírus pertencente a família *Paramyxoviridae*, sub família *Pneumovirinae* e gênero *Metapneumovirus*. Possui um genoma de 13 KB, sendo a informação genética contida em RNA sentido negativo, é um vírus segmentado, pleomórfico e envelopado. Cerca de 35% dos casos de IRA, não obtém-se o agente causal, portanto, a identificação do hMPV se faz importante, pois o leque de agentes virais causadores de IRA utilizados como rastreamento pelo LACEN-RS por técnicas como IF indireta são (Influenza A e B, Parainfluenza 1, 2 e 3, Adenovírus e Vírus Sincicial Respiratório Humano (hVRS)) e por RT-PCR; Influenza A e B, bem como, tipificação em A H1N1pdm09 e H3, não contemplando desta forma a pesquisa de hMPV.

OBJETIVOS

Verificar a eficiência da IF Direta para detecção do hMPV caracterizando assim, a presença do hMPV em amostras de pacientes onde não foram detectados os principais agentes virais nos anos de 2009 e 2011, bem como, comparar a especificidade e sensibilidade entre os ensaios de IF Direta com o padrão de referência PCR em tempo real.

MATERIAIS E MÉTODOS

Analisadas 328 amostras de aspirado de nasofaringe (ANF) de pacientes com SRAG encaminhadas para o LACEN-RS entre os anos de 2009 e 2011, estas anteriormente, foram submetidas aos ensaios de IFD para detecção do hMPV sendo realizado conforme protocolo do fabricante (Millipore - Human Metapneumovirus DFA Reagent, RUO - Código 5091RU0.



Extração do RNA pelo protocolo de adsorção em sílica (BOOM et al., 1990)⁵.



Transcrição Reversa e Amplificação do cDNA viral pela técnica RT-PCR em tempo real, posterior avaliação do gráfico de amplificação, objetivando delimitar a positividade amostral.

As amostras consistiram de aspirado de nasofaringe, onde previamente a presença dos principais agentes virais não foram confirmadas pelo LACEN-RS. O gene F foi utilizado para amplificação e detecção.

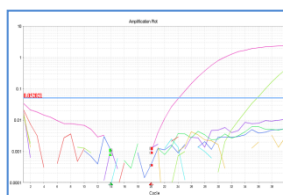


Figura 1: Detecção por RT-PCR em tempo real, gráfico de amplificação.

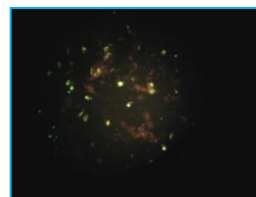


Figura 2: Microscopia de fluorescência.

RESULTADOS

A comparação entre os ensaios de IFD e RT-PCR em tempo real, demonstrou que entre 328 amostras analisadas, de um total de 58 (17,7%) foram positivas pelo menos por uma das duas técnicas. Considerando a PCR em tempo real como teste de referência, observou-se uma taxa alta de concordância (86%) e especificidade (98,5%), o que resulta em um baixo número de falsos positivos. A grande limitação encontrada na técnica de IFD foi sua baixa sensibilidade (27,6%), o que implica em um grande número de falsos negativos, tais achados são semelhantes com estudos anteriores.²⁻⁴⁻⁶

CONCLUSÃO

Inferindo uma análise crítica, entendemos que a baixa sensibilidade da IFD compromete sua utilização, primordialmente no LACEN-RS, sendo este possuidor de uma infraestrutura própria que contempla a plataforma de PCR em tempo real. Substancialmente, o custo de cada ensaio não difere de forma significativa (aproximadamente R\$15,00) entre as duas técnicas, portanto, se faz coerente a utilização do diagnóstico molecular para detecção do hMPV, otimizando precocemente e dinamicamente a rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS

- 1 ALTO, WA. Human metapneumovirus: a newly described respiratory tract pathogen. *J Am Board Fam Pract.*, v.17, n.6, p.466-9, 2004.
- 2 ASLANZADEH, J. et al. Prospective evaluation of rapid antigen tests for diagnosis of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections. *J Clin Microbiol.*, v. 46, n. 5, p. 1682-5, 2008.
- 3 BOOM, R.C.J.A. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, vol.28, p.495-503, 1990.
- 4 GERNA, G. et AL. Prospective study of human metapneumovirus infection: diagnosis, typing and virus quantification in nasopharyngeal secretions from pediatric patients. *J Clin Virol*, v. 40, n. 3, p. 236-40, 2007.
- 5 KAHN JS. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev.*, v.19, n. 3, p.546-57, 2006.
- 6 PARMEZAN, SN.; PASTERNAK, J2; DEZENE, AHP.; MARTINO, MDV.; SOUZA,AV. Estudo comparativo de detecção de metapneumovírus humano pelos métodos de PCR e imunofluorescência direta. *J Bras Patol Med Lab* • v. 47 • n. 4 • p. 427-430 • agosto 2011 .