UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

LUIS FELIPE DIAS DE JESUS

ESTUDO DE VALIDAÇÃO DO KIT MOLECULAR INFA/INFB/SC2 BIO-MANGUINHOS

BRASÍLIA, 2024

LUIS FELIPE DIAS DE JESUS

ESTUDO DE VALIDAÇÃO DO KIT MOLECULAR INFA/INFB/SC2 BIO-MANGUINHOS

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Haddad

Co-orientadora: Dra. Évelin Mota Cassemiro

BRASÍLIA, 2024

LUIS FELIPE DIAS DE JESUS

ESTUDO DE VALIDAÇÃO DO KIT MOLECULAR INFA/INFB/SC2 BIO-MANGUINHOS

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br
RODRIGO HADDAD
Data: 07/08/2024 08:17:48-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Haddad

(Universidade de Brasília)

Documento assinado digitalmente
gov.br
EVELIN MOTA CASSEMIRO DA COSTA
Data: 07/08/2024 11:12:06-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Co-Orientadora: Me. Évelin Mota Cassemiro

(Universidade de Brasília)

Documento assinado digitalmente
gov.br
PAMELA MARIA DE OLIVEIRA
Data: 07/08/2024 10:43:34-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Me. Pâmela Maria de Oliveira

(Universidade de Brasília)

Documento assinado digitalmente
gov.br
ALICIA CAVALCANTE MAIA
Data: 07/08/2024 10:31:11-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Alicia Cavalcante Maia

(Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha família, à minha namorada e a todos amigos e colegas que fizeram parte da minha graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Josélio José de Jesus e Maria de Jesus Dias Pereira por todo o amor, pelo apoio incondicional e pela a chance de ter acesso ao melhor nível de educação que as nossas condições financeiras pudessem oferecer, que trabalham todos os dias para me permitir sonhar e sonhar alto. Que possibilitaram explorar a minha potencialidade acadêmica. Que me possibilitaram almejar um futuro brilhante.

Ao meu irmão Luis Fernando e à minha tia Laurene que viveram comigo a maior parte da minha vida e fizeram parte da minha criação enquanto meus pais estavam trabalhando e em todos os momentos que compartilhamos juntos.

Sou grato à minha namorada, Yara Hanna e toda a sua família, que é minha família também, por todo o apoio durante estes 5 anos e meio de graduação. Todo o acolhimento e amor que me deram muita força durante esse tempo.

Ao Professor Rodrigo Haddad pela oportunidade de monitoria em sua disciplina e pela oportunidade de se juntar a um projeto tão incrível como este Trabalho de Conclusão de Curso.

Agradeço à minha co-orientadora, Évelin Mota Cassemiro e as pesquisadoras pela Universidade de Brasília do laboratório que desenvolvi o projeto: Pamela Maria de Oliveira, Alicia Cavalcante Maia e Tatyane de Souza Cardoso Quintão que me proporcionaram dar andamento na pesquisa e sem elas as eu não conseguiria tocar este projeto. Agradeço toda a paciência, conhecimentos passados, tempo investido, recursos e prestatividade para me auxiliar nessa pesquisa.

Aos meus amigos e colegas de Universidade que me apoiaram e me ajudaram com minhas dificuldades durante a graduação e nos momentos que mais precisei. A troca de vivências, conhecimentos e momentos foram muito importantes para meu crescimento pessoal.

E por fim, ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica pela bolsa que me permitiram ter recursos para tocar o projeto.

RESUMO

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) disponibiliza kits diagnósticos que são capazes de detectar os vírus SARS-COV-2, influenza A e B pelo método RT-PCR, através de uma amostra única. Até o fim de 2022, MS disponibilizou o kit Allplex™ SARS- CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay destinado a detecção dos vírus SARS- CoV-2, vírus Influenza A e B e Vírus Sincicial Respiratório (VSR) A/B em uma única amostra. A partir do início de 2023, o MS o substituiu e passou a disponibilizar o kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos, um ensaio quadriplex que detecta regiões genômicas específicas de Influenza A (INFA), Influenza B (INFB) e do SARS-CoV-2 (SC2), no Sistema Único de Saúde (SUS). O objetivo deste trabalho foi validar o kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos através de análise comparada ao kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay. A metodologia adotada foi a realização de coleta de material biológico da nasofaringe de pacientes com quadro de síndrome gripal, extração de ácidos nucleicos e seguida de análise das amostras pelo método de RT-PCR. Os resultados encontrados neste trabalho para o estudo de validação do kit molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos em comparação ao kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay se mostraram inconclusivos.

Palavras-chave: Sars-Cov-2; Influenza A; Influenza B; kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos; RT-PCR.

ABSTRACT

In Brazil, the Ministry of Health (MS) provides diagnostic kits that are capable of detecting the SARS-COV-2, influenza A and B viruses using the RT-PCR method, through a single sample. By the end of 2022, the Ministry of Health made available the Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay kit for the detection of the N, RdRP and S genes of SARS-CoV-2, Influenza viruses A and B and syncytial virus respiratory (RSV) A/B in a single sample. From the beginning of 2023, the MS replaced it and started to make available the Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos kit, a quadriplex assay that detects specific genomic regions of Influenza A (INFA), Influenza B (INFB) and SARS -CoV-2 (SC2), currently used in the Unified Health System (SUS). The objective of this work was to evaluate the INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos Molecular kit through accuracy analysis compared to the Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay kit. The methodology adopted was to collect biological material from patients with flu syndrome who sought care at the Basic Health Unit of Cidade Estrutural (DF) in the year 2022. Both kits were used in accordance with the manufacturer's recommendations. The results found in this work for the accuracy study of the INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos molecular kit in comparison to the Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay kit was inconclusive.

Keywords: Sars-cov-2; Influenza A; Influenza B; Molecular INFA/INFB/SC2; Bio-Manguinhos kit; RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da extração de amostra biológica, Controle Positivo e Controle Negativo do molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos.....20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidência de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) até a 52 º semana epidemiológica no Distrito Federal.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2 - Critérios para análise de interpretação de uma rotina válida para o kit molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3 - Critérios para interpretação de resultados do Kit molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos .....**Erro! Indicador não definido.**1

Tabela 4 - Resultados obtidos no kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay .....**Erro! Indicador não definido.**2

Tabela 5 - Resultados obtidos no kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-manguinhos. .....**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cDNA	DNA Complementar
CI	Controle interno
CNEG	Controle Negativo
CPOS	Controle Positivo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribunucleicos Fosfatados
FDA	Foods and Drugs Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H	Hemaglutinina
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INFA	Vírus da Influenza A
INFB	Vírus da Influenza B
IRA	Infecção Respiratória Aguda
MS	Ministério da Saúde
N	Neuraminidase
NAAT	Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos
ONU	Organização das Nações Unidas
RNA	Ácido Ribonucléico
RP	Rnase P
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SC2	SARS-COV-2
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SUS	Sistema Único de Saúde
UBS	Unidade Básica de Saúde
UDG	Uracil-DNA glicosilase
VSR	Virus Sincicial Respíratório
VTM	Meio de Transporte Viral

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 12
2 **REVISÃO DE LITERATURA** 13
2.1 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO SARS-COV-2 E INFLUENZAS A E B 13
2.2 DINÂMICAS DE CIRCULAÇÃO DO SARS-COV-2 E INFLUENZAS A E B 15
3 **OBJETIVOS** 17
3.1 OBJETIVO GERAL 17
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS 17
4 **JUSTIFICATIVA** 17
5 **MATERIAIS E MÉTODOS** 18
5.1 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO 18
5.2 EXTRAÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO VIRAL 18
5.3 RT-PCR 18
5.4 DEFINIÇÃO DE AMOSTRA E MÉTODO DE ANÁLISE 18
5.5 ANÁLISE DE ACURÁCIA 19
5.6 ASPECTOS GERAIS DO KIT ALLPLEX™ SARS-COV-2/FLUA/FLUB/RSV ASSAY 19
5.7 KIT MOLECULAR INFA/INFB/SC2 BIO-MANGUINHOS 19
5.7.1 **Princípio de funcionamento do teste** 20
5.7.2 **Interpretação dos resultados** 21
6 **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 22
6.1 O VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL (VSR) 23
6.2 COINFECÇÕES 24
6.3 HIPÓTESES SOBRE OS RESULTADOS DE INFLUENZA A 24
7 CONCLUSÃO 25
REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 26

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, a humanidade enfrentou numerosas epidemias e pandemias que afetaram milhões de vidas. Mesmo com o avanço da medicina e pesquisas nesse campo, o desafio de lidar com patógenos que ameaçam a vida humana, as economias globais e os sistemas de saúde em todo o mundo continua presente (Chams et al. 2020). Exemplos destes patógenos são vírus que causam Infecções Respiratórias Agudas (IRA) de importância clínica como o SARS-COV-2, que causa o COVID-19 e os vírus da família *Orthomyxoviridae* que podem causar 3 tipos de influenza: A, B e C em humanos (Brasil. Ministério da Saúde). O SARS-COV-2 é um coronavírus que pertence ao grupo beta- coronavírus, que também inclui o MERS-Cov e o SARS-Cov. Este grupo é originário de mamíferos, como morcegos, que causam severas e muitas vezes fatais doenças em humanos (Chams *et al*. 2020).

De acordo com Ochani *et al*, os sintomas típicos da Covid-19 incluem febre, tosse, dispneia, mialgia ou fadiga. A maioria dos pacientes apresentam condições leves da Doença, mas existe uma parcela dos pacientes que acaba desenvolvendo hipóxia severa com necessidade de internação hospitalar e auxílio de respiração mecânica (Ochani *et al*, 2021). Com a emergência sanitária da Covid-19, muitas vacinas foram desenvolvidas com diversas tecnologias de desenvolvimento, principalmente com a utilização de RNA, DNA, o vírus atenuado, entre outras (Li *et al*, 2022). Atualmente, existe a possibilidade de tratamento antirretroviral da Doença como com o uso do Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir) que em estudo feita por (Hashmian *et al*, 2023) o medicamento apresentou potencial antiviral contra variantes do coronavírus apesar de constante mudança em seu genoma viral.

Os vírus influenza A e B são responsáveis por epidemias sazonais, sendo o vírus influenza A responsável pelas grandes epidemias em território nacional (Brasil. Ministério da Saúde,2023). O vírus causador da influenza tipo A está presente em diversos mamíferos e aves, sendo classificado a partir de uma combinação proteica entre a Hemaglutinina (H) e a Neuraminidase (N) para definição de nomenclatura. A H1N1, responsável por uma pandemia em 2009, é exemplo de variante da Influenza A. A influenza B afeta exclusivamente os humanos e é subdividida em 2 linhagens: a B/ Yamagata e a B/Victoria. (Brasil. Ministério da Saúde, 2023). As Influenzas são altamente contagiosas e seus sintomas costumam ser febre, tosse, calafrios, sudorese, mialgia e mal-estar (Gaitonde, Moore, Morgan, 2019). Segundo Kumar et

al, 2020 uma redução significativa das mortes causadas pelos vírus da Influenza A e B são devido a administração de vacinas e ao uso de medicamentos como o oseltamivir, um inibidor da proteína N.

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) disponibiliza kits diagnósticos que são capazes de detectar os vírus supracitados e possíveis coinfecções pelo método Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) através de uma amostra única de material biológico da nasofaringe. Devidamente certificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), até o fim de 2022, o MS disponibilizou o kit Allplex™ SARS- CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay destinado à detecção dos genes N, RdRP e S de SARS- CoV-2, vírus Influenza A e B e Vírus Sincicial Respiratório (RSV) A/B em uma única amostra. A partir do início de 2023, o MS o substituiu e passou a disponibilizar o kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos, um ensaio quadriplex que detecta regiões genômicas específicas de Influenza A (INFA), Influenza B (INFB) e do SARS-CoV-2 (SC2), atualmente utilizado no Sistema Único de Saúde (SUS).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO SARS-COV-2 E INFLUENZAS A E B

No início da pandemia do novo Coronavírus, além de testes moleculares, foram produzidos testes sorológicos que detectam anticorpos das classes de Imunoglobulinas: IgA, IgM, IgG e anticorpos totais. Com a emergência sanitária vivida nos últimos anos, agências reguladoras como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Food and Drugs Administration (FDA) aprovaram, condicionalmente, diversos testes diagnósticos sem que houvesse o devido conhecimento da qualidade dos mesmos (Martinello,2021).

Em contraponto a sorologia, o RT-PCR oferece informações de infecção nos estágios iniciais de infecção, por conta de sua capacidade de detecção direta do patógeno antes mesmo da produção de anticorpos contra o vírus. Até 17 de agosto de 2020, 50 empresas já haviam registrado testes para detecção do SARS-CoV-2 junto à ANVISA pelo método de RT-PCR. Tanto os kits quantos os métodos *in house* envolvem as mesmas etapas: 1- Extração do RNA, geralmente feita com um tampão de lise; 2- Transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA), feita utilizando como molde uma fita de RNA para síntese de uma fita de DNA com

utilização de primers específicos e 3- Reação em cadeia da polimerase em tempo real, que amplifica os trechos de interesse do RNA viral. (Menezes, M.E.; Lima, L.M.; Martinello, f., 2020).

A reação de RT-PCR ocorre em tempo real, utilizando primers e desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) marcados por fluorescentes, a emissão e detecção ocorrem durante a reação de PCR, diferente do que ocorre na reação de PCR convencional na qual os resultados são visualizados em padrões de bandas em eletroforese. (Menezes, M.E.; LA, Lima.M.; Martinello, F., 2020).

Atualmente, os principais métodos para diagnóstico molecular direto, que identificam diretamente o RNA ou antígeno viral do SARS- CoV-2 são o RT- PCR; repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas (CRISPR) e a amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP) (Martinello, 2021). O método de RT-PCR é considerado o padrão ouro para a detecção do SARS-CoV-2 (Yang *et al,* 2021). A literatura indica que no ano de 2020 a taxa de falso-negativo para testes para Covid-19 pelo método de RT-PCR foi de aproximadamente 20%. Considerando o mesmo período, os testes RT-PCR levavam em média 48 horas para gerarem resultados, no entanto, os atrasos no transporte das amostras aumentavam o retorno dos resultados à população (Verotti et al, 2020). Atualmente, com o avanço da técnica, é possível liberar os resultados passando por toda a cadeia logística em menos de 24 horas.

Em geral, a Influenza é uma doença autolimitada, os altos riscos de desenvolvimento de complicações acontecem em idosos; crianças; grávidas e indivíduos com condições crônicas como asma; desordens hematológicas, neurológicas e metabólicas; desordens cardíacas congênitas e imunossuprimidos. O período de incubação do vírus ocorre entre 3 e 5 dias em adultos e em algumas semanas em crianças e imunodeprimidos (Darmaphalan, 2020). A disponibilidade de técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos (NAAT) como o RT-PCR revolucionou o diagnóstico da gripe, adotado como padrão ouro para a sua detecção.

Estas técnicas possuem alta sensibilidade e especificidade. A técnica LAMP também demonstra uma alta sensibilidade de 98% e especificidade de 100% quando comparado ao RT- PCR. Quanto aos testes que utilizam imunofluorescência direta apresentam boa sensibilidade, entre 60 e 80%. Quando avaliados durante a pandemia de H1N1 comparados a técnica de PCR, apresentou resultados de sensibilidade entre 38 e 93% (Darmaphalan, 2020). Para (Martinello, 2021), poucos estudos apresentam

dados de desempenho analítico de testes moleculares com precisão intra e interensaio, exatidão, limite de detecção, avaliação de interferentes, linearidade e sensibilidade analítica, o que não deixa claro para os laboratórios quais ensaios apresentam melhor desempenho.

2.2 DINÂMICAS DE CIRCULAÇÃO DO SARS-COV-2 E INFLUENZAS A E B

A Organização Mundial de Saúde (ONU) enfatizou a importância de garantir as melhores práticas de cuidado para combate da Influenza durante o crescimento da alocação de recursos e atenção para a Covid-19. Medidas não farmacológicas como distanciamento social, uso de máscaras faciais, lavagem das mãos adotadas em muitos países durante a pandemia da Covid-19 ajudaram a reduzir significantemente infecções por Influenza.

Nos momentos iniciais da pandemia do novo coronavírus, a disponibilidade de vacinas, antirretrovirais e o entendimento avançado sobre as dinâmicas de transmissão da Influenza contrastam com situação atual de conhecimento sobre o SARS-CoV-2, no qual o entendimento que se tinha sobre estes aspectos era inferior ao que se tinha comparado ao vírus da Influenza (Chotpitayasunondh, 2020). A potencial coinfecção por SARS-CoV-2 e o vírus da Influenza é bastante documentada. O impacto clínico desta coinfecção era desconhecido nos estudos de caso reportados no princípio de pandemia. O uso de antirretrovirais nos pacientes faz com que seja dificultado conhecer o real impacto da coinfecção sem nenhuma intervenção terapêutica. Outro fator que deve ser considerado quando os Vírus da Influenza e o SARS-CoV-2 estão circulando ao mesmo tempo é a possibilidade de interferência na prevalência e severidade das infecções que eles causam. Modelos que exploram essa dinâmica mostram que vírus respiratórios circulando simultaneamente podem exercer influências positivas e negativas uns nos outros, além de afetarem a resposta inata dos indivíduos (Chotpitayasunondh, 2020).

As infecções pelos vírus da Influenza e o SARS-CoV-2 apresentam incidências significativas no Distrito Federal (DF). Segundo a Secretaria de Saúde do DF no ano de 2022, até a 52 º semana epidemiológica, considerando residentes do DF, foram registrados 8730 casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG). Destes casos foram registrados 4377 por vírus respiratórios, sendo o SARS- CoV-2 o agente mais frequente de casos (3173) e óbitos (733) (ver tabela 1). Os números de casos e

óbitos para Influenza no mesmo período foram de 201 e 5, respectivamente, sendo estes óbitos causados por infecções do vírus da influenza A.

Tabela 1 - Incidência de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) até a 52 º semana epidemiológica no Distrito Federal.

Etiologia da SRAG	Casos		Óbitos	
	n	%	n	%
SARS-CoV-2	3.173	36,3	733	69,7
Influenza	201	2,3	5	0,5
Outros vírus respiratórios	1.003	11,5	7	0,7
Outros agentes etiológicos	7	0,1	2	0,2
Não especificado	4.248	48,7	304	28,9
Em investigação	98	1,1	0	0,0
Total	**8.730**	**100,0**	**1.051**	**100,0**

Fonte: Adaptado SIVEP Gripe (2022).

Com base nos dados da Vigilância Sentinela de Síndrome Gripal do DF, realizada em serviços de saúde que monitoram a circulação de vírus respiratórios causadores de síndrome gripal, da primeira até a 52° semana epidemiológica de 2022, foram registradas 1263 coletas de amostras biológicas. As 8 unidades sentinelas existentes naquele momento (UBS 2 Asa Norte, UBS 1 Paranoá, UBS 12 Ceilândia, UBS 5 Planaltina, UBS 12 Samambaia, UPA Núcleo Bandeirante, UBS 01 Santa Maria, Hospital Brasília Lago Sul) registraram, em 2022, 391 amostras positivas para vírus respiratórios, dentre elas foi detectada a presença do vírus Sars-Cov-2 (240), Influenza em (64) Rinovírus (46), Metapneumovírus (46), Adenovírus (4), Parainfluenza 3 (1) e Vírus Sincicial respiratório (23). Houve a detecção de 5 coinfecções por vírus respiratórios.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Validar o kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos através da análise de acurácia e análise estatística do comparado ao kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever e discutir as vantagens e desvantagens do kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos em relação ao kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay.
- Avaliar acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razão de verossimilhança positiva e razão de verossimilhança negativa do novo teste em comparação ao anterior.
- Avaliar estatisticamente a prevalência da Covid-19 e infecções pelas Influenzas A e B em pacientes do Hospital Universitário de Brasília submetidos à coleta de material biológico nasofaríngeo;

4 JUSTIFICATIVA

A adoção por parte do Ministério da saúde do kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos em detrimento do kit Allplex™ SARS- CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay para a detecção de SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B pelo método RT-PCR em pacientes atendidos pelo SUS não apresentou nenhum teste de acurácia que comparasse os dois kits. Logo, não há como saber se a troca de kit trouxe ganhos ou prejuízos em relação a detecção dos vírus supramencionados. Diante desse cenário, a comparação dos kits trará luz a essa discussão. Tendo em vista a prevalência epidemiológica de IRAs, causadas por vírus respiratórios como o SARS-COV-2, Influenza A e Influenza B, existe uma demanda significativa de recursos humanos e financeiros que pressionam o SUS em determinadas épocas do ano as quais doenças respiratórias virais são mais comuns.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras utilizadas nesse estudo são amostras de pacientes com quadro de síndrome gripal que procuraram atendimento na Unidade Básica de Saúde da Cidade Estrutural (DF). Os pacientes foram entrevistados, assinaram o termo de consentimento e tiveram amostra de swab nasofaríngeo coletada. Para a coleta, foi utilizado 1 swab de rayon, inserido nas duas narinas, armazenado em um tubo contendo meio de transporte viral – VTM (Laborclin) e posteriormente armazenadas em temperatura adequada.

5.2 EXTRAÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO VIRAL

Para a obtenção do material genético viral, foi realizada a extração automatizada de ácidos nucleicos, a partir de 100 µL da amostra de swab nasofaríngeo coletada em tampão VTM, utilizando o kit para extração e purificação EXTRACTA KIT FAST – DNA e RNA Viral (MVXA-P016 FAST–LOCCUS, São Paulo, Brasil) e o sistema automatizado EXTRACTA 32 (LOCCUS).

5.3 RT-PCR

Para a avaliação de acurácia do kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos, foi utilizado este kit e o Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay. Ambos os kits foram utilizados de acordo com as recomendações do fabricante. Para ambos o kit Bio-Manguinhos foi utilizado o equipamento QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e para o kit Allplex foi utilizado o equipamento CFX Seegene para amplificação do material genético.

5.4 DEFINIÇÃO DE AMOSTRA E MÉTODO DE ANÁLISE

Para a realização do estudo de acurácia do Kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos foram utilizadas 111 amostras de material biológico da nasofaringe de pacientes com quadro de síndrome gripal que procuraram atendimento na Unidade Básica de Saúde da Cidade Estrutural (DF) durante o ano de 2022. Neste estudo, o critério para análise dos resultados das amostras foi definido entre positivo e negativo para todos os vírus em ambos os kits a partir do Cycle Threshold (Ct) definido pelos

fabricantes e análise de curva de amplificação dos vírus nos softwares utilizados para posterior determinação de acurácia.

5.5 ANÁLISE DE ACURÁCIA

A avaliação de acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razão de verossimilhança positiva e razão de verossimilhança negativa será calculada individualmente para cada alvo de detecção viral do kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos através da calculadora estatística *OpenEpi Module for Diagnostic Test Evaluation*, tendo como padrão ouro os resultados do kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay após a obtenção dos resultados das amostras.

5.6 ASPECTOS GERAIS DO KIT ALLPLEX™ SARS-COV-2/FLUA/FLUB/RSV ASSAY

O kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay é um ensaio PCR multiplex em tempo real para detecção de quatro alvos virais. O kit é capaz de detectar e amplificar os genes: RdRP e N do SARS-CoV-2, o vírus da Influenza A, o vírus da Influenza B e o Vírus Sincicial Respiratório (VSR). O Kit também apresenta dois Controles internos (CI), ambos os controles são utilizados para monitorar a extração e para verificar alguma possível inibição do PCR (Seegene, 2022).

Os reagentes disponibilizados pelo fabricante são: o SC2FabRMOM, um oligoMIx para detecção e amplificação das amostras; o EM8, que consiste numa mistura de RTase, Polimerase DNA, Uracil-DNA glicosilase (UDG) e tampão com Desoxirribonucleico Fosfatados (dNTPs); o controle positivo SC2FabRPC, mistura de patógeno e clones; o o CI exógeno e água ultrapura para realização de PCR. Todo o procedimento de extração, amplificação e análise das amostras à obtenção dos resultados foram realizados conforme a bula disponibilizada pelo fabricante.

5.7 KIT MOLECULAR INFA/INFB/SC2 BIO-MANGUINHOS

O Kit molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos é um produto que consiste em um ensaio quadriplex disponibilizado pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) ao SUS para detecção de regiões genômicas específicas de Influenza A, Influenza B e SARS-COV-2, além do Controle Interno (CI), que é a Rnase P(RP), gene constitutivo

humano (FIOCRUZ, 2022). O Kit é capaz de detectar na reação, 1 cópia/µL (10 cópias/reação) para o alvo INF A, 1 cópia/ µL (10 cópias/reação) para o alvo INF B e 1 cópia/µL (10 cópias/reação) para o alvo SC2 (FIOCRUZ, 2022).

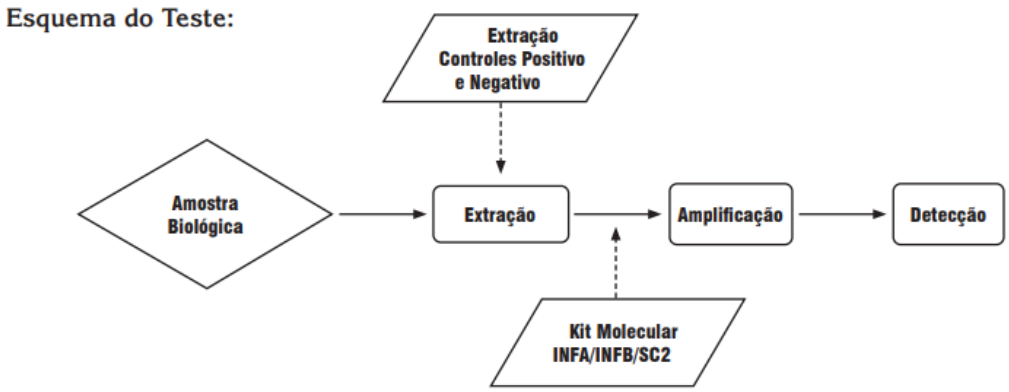
O Kit molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos foi desenvolvido para que não ocorra reação cruzada com os vírus: Rinovírus, Metapneumovírus E Vírus Sincicial Respiratório (VSR), com especificidade clínica de 99,9% e especificidade analítica de 100% e quando testadas amostras conhecidamente positivas, apresentou 100% de concordância para Influenza A, Influenza B e SARS-CoV-2 (FIOCRUZ, 2022).

O fabricante oferece dois reagentes no kit, os reagentes de amplificação que são a Mistura de PCR e o MIX (INFA/INFB/SC2/RP) e os controles que são o Controle Positivo (CPOS) e o Controle Negativo (CNEG).

5.7.1 Princípio de funcionamento do teste

a) Extração das amostras biológicas e dos controles positivo e negativo;
b) Amplificação do ácido nucleico;
c) Detecção do material pelo método de RT-PCR,

Figura 1 - Desenho esquemático da extração de amostra biológica, Controle Positivo e Controle Negativo do molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos.



Fonte: Adaptado de (Fiocruz, 2022).

Para que a corrida seja considerada válida, nos resultados do CNEG os alvos genômicos de INFA, INFB e RP devem ter (Ct ≤ 35). Para os resultados do CPOS

para a rotina ser considerada válida o Ct para INFA e INFB devem ter (Ct ≤27) para os alvos SC2 e RP (ver tabela 2).

Tabela 2 - Critérios para análise de interpretação de uma rotina válida para o kit molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos.

Controle	Ct	Resultados
Negativo	Não detectado para os alvos INFA, IFB e SC2. Detectado para o alvo RP Ct ≤ 35	Rotina válida
	Ct ≤ 40 para os alvos INFA, INFB e SC2	Rotina inválida. Repetir o teste. Possível contaminação.
Positivo	Ct ≤ 27 para INFA e INFB; Ct ≤ 29 para SC2 e RP	Rotina válida
	Ct > 27 para INFA e INFB; Ct > 29 para SC2 e RP	Rotina inválida. Repetir o teste, possível perda de amostra e/ou problema durante a preparação das misturas de RT-PCR

Fonte: Adaptado de (Fiocruz, 2022).

5.7.2 Interpretação dos resultados

Para a interpretação dos resultados, o fabricante estabelece os critérios de aceitação para detecção dos alvos com relação ao Ct obtido na corrida. Para ser considerado detectado, os alvos SC2, INFA e INFB devem ter o (Ct ≤ 40) e a (RP ≤ 35) para ser considerado detectado e para ser considerado não detectado (< 35 e ≤ Ct 40) (ver tabela 3). Todo o procedimento de extração, amplificação e análise das amostras à obtenção dos resultados foi realizado conforme a bula disponibilizada pelo fabricante.

Tabela 3 - Critérios para interpretação de resultados do Kit molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos

Alvo	Valor de Ct	Resultado
INFA	Ct ≤ 40	Detectado

INFB	Ct ≤ 40	Detectado
SC2	Ct ≤ 40	Detectado
RP	Ct ≤ 35	Detectado
	35 < Ct ≤ 40	Não detectado

Fonte: Adaptado de (Fiocruz.2022).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay apresentou resultados positivos de: 13 (11.7%) para Sars-Cov-2, 40 (36%) para Influenza A e de 0 (0%) para Influenza B. Os resultados para o alvo de detecção do VSR não foram considerados para este estudo. Todas as amostras que apresentaram resultado positivo para Sars-cov-2 foi possível a detecção dos dois genes alvos: N e RdRP. (ver Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados obtidos no kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay

Alvo de detecção (vírus)	Positivos		Negativos	
	n	%	n	%
SARS-CoV-2	13	11,7	98	88,3
Influenza A	40	36,0	71	64,0
Influenza B	0	0,0	111	100,0

Fonte: Elaboração própria a partir dos resultados obtidos no estudo.

O número de resultados positivos encontrados para o kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-manguinhos foram: 13 (11,7%) para Sars-cov-2, para Influenza A 111 (100%) e para Influenza B 0 (0%) (Ver Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados obtidos no kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-manguinhos.

Alvo de detecção (vírus)	Positivos		Negativos	
	n	%	n	%
SARS-CoV-2	13	11,7	98	88,3
Influenza A	111	100,0	0	0,0
Influenza B	0	0,0	111	100,0

Fonte: Elaboração própria a partir dos resultados obtidos no estudo.

A análise estatística para a obtenção de acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razão de verossimilhança positiva e razão de verossimilhança negativa para cada alvo de detecção do kit molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos não foi realizada devido aos resultados muito destoantes encontrados de Influenza A, que indicam a possibilidade de erro em alguma etapa do processo. Para determinação exata da existência deste erro será necessário a continuidade posterior do estudo.

6.1 O VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL (VSR)

O VSR pode acarretar severas complicações no trato respiratório, especialmente em crianças jovens e idosos. Apesar do seu impacto nos sistemas de saúde globais, segundo (Gatt, Martin; Alfouzan, Moraes, 2023), não há nenhuma vacina aprovada para a prevenção do VSR e o seu tratamento em sua maioria se caracteriza por terapias de suporte ao paciente. Em estudo publicado por (Freitas *et al*. 2024), que avaliou 269 crianças com SRAG no período de 2013 a 2019 em um hospital de referência no Distrito Federal, 152 crianças (54%) apresentaram infecção por vírus sincicial. Como conclusão de análise, os autores enfatizaram a necessidade de uma diminuição do tempo de diagnóstico para que se tenha uma maior celeridade na resposta clínica e para que se evite o uso inadequado de antibióticos e antivirais.

Tendo em vista o cenário de uma maior velocidade no diagnóstico laboratorial do VSR, o kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay que detecta e amplifica o VSR presente em amostras biológicas seria de importante valia, pois o procedimento do recebimento de uma amostra pelo profissional técnico capacitado até a obtenção

do resultado pode durar poucas horas a depender da rotina do laboratório. Por outro lado, o Kit molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos não apresenta alvos de detecção e amplificação para o VSR, em quadros clínicos que exista a suspeita de infecção por este vírus, seria necessário um outro kit que detecte este único alvo, trazendo uma maior lentidão no diagnóstico do paciente.

6.2 COINFECÇÕES

Em análise feita por (Krumbein et al, 2023) de 53 estudos que englobam 16643 pacientes com diagnóstico de COVID-19 confirmado apresentaram relativa baixa incidência de coinfecções por vírus respiratórios, mas com maior prevalência para as Influenzas. Por outro lado, os pacientes coinfectados apresentaram maiores chances de terem resultados clínicos mais severos. Por conta da inespecificidade sintomática de doenças causadas por vírus respiratórios com a Covid-19, a testagem através de painel viral é recomendável.

6.3 HIPÓTESES SOBRE OS RESULTADOS DE INFLUENZA A

Foi possível encontrar grande discrepância entre os resultados apresentados do kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos: 111 amostras em relação ao kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay: 40 amostras para o alvo de detecção Influenza A. Esta diferença não foi verificada para os outros alvos de detecção: Sars-cov-2, com 13 resultados positivos e Influenza B com nenhum resultado positivo, para ambos os kits. A hipótese de problema técnico com os reagentes para a detecção da Influenza A não pode ser descartada, sendo altamente recomendável a repetição das análises. A presença de resultado positivo para Influenza A em todas as amostras do kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos orienta a iniciar a investigação por este kit.

A possibilidade de erros em testes realizados pela técnica de RT-PCR é descrita na literatura. Recomendações que passam por uma padronização de garantia e controle de qualidade dos insumos, inclusão de controles, diretrizes de interpretação, determinação de amostra adequada e comparações interlaboratoriais para garantir uma maior confiabilidade nos resultados são essenciais para que erros nessa técnica sejam mitigados (Ahmed et al, 2021).

7 CONCLUSÃO

O kit molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos apresenta vantagem diagnóstica por possibilitar a detecção simultânea de 3 vírus respiratórios diferentes (SARS-COV-2, Influenza e A e B) e liberação de resultados a partir de uma única amostra biológica em poucas horas. Em comparação ao Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay apresenta a desvantagem de não detectar o VSR, vírus de relevância epidemiológica.

Verifica-se a necessidade de maior investigação, principalmente dos resultados obtidos para Influenza A. Para isto, tem se como necessários mais estudos, determinação de amostra adequada e angariação de recursos que possibilite a repetição das análises desejadas, para que então, seja possível um estudo de acurácia do kit molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos satisfatório.

Através deste trabalho, o estudo de acurácia do kit molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos foi inconclusivo.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Gripe (influenza). 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/g/gripe-influenza>.

Boletim Epidemiológico 32 - Síndrome Gripal e Síndrome Respiratória Aguda Grave no Distrito Federal. Brasília. Secretária de Saúde do Distrito Federal, Subsecretaria de Vigilância em Saúde.2023. n.32, 1° a 52° semana epidemiológica de 2022, jan/dez. Disponível em: https://www.saude.df.gov.br/gripe-1.

CHAMS, N. et al. “COVID-19: A Multidisciplinary Review.” **Frontiers in public health,** vol. 8 383. 29 Jul. 2020, doi:10.3389/fpubh.2020.00383. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32850602/.

CHOTPITAYASUNONDH, T. et al. “Influenza and COVID-19: What does co-existence mean?.” Influenza and other respiratory viruses vol. 15,3 (2021): 407-412. doi:10.1111/irv. 12824;. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33128444/

DHARMAPALAN, D. “Influenza.” **Indian journal of pediatrics,** vol. 87,10 (2020): 828-832. doi:10.1007/s12098-020-03214-1. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32048225/ .

FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz. Kit Molecular INFA/INFB/SC2-Biomanquinhos: Teste para detecção de Influenza A, Influenza B e de SARS-CoV-2. Rio de Janeiro, (2022): 1-7.

FREITAS, F. T. et al. “Evaluation of Severe Acute Respiratory Syndrome surveillance caused by respiratory viruses in a pediatric unit, 2013 to 2019.” **Revista paulista de pediatria: órgão oficial da Sociedade de Pediatria de Sao Paulo**, vol. 42 e2022215. 25 Aug. 2023, doi:10.1590/1984-0462/2024/42/2022215. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37646750/.

GAITONDE, D. Y. et al. “Influenza: Diagnosis and Treatment.” **American family physician.** vol. 100,12 (2019): 751-758. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31845781/

GATT, D. et al. “Prevention and Treatment Strategies for Respiratory Syncytial Virus (RSV).” Pathogens basel, **Switzerland,** vol. 12,2 154. 17 Jan. 2023, doi:10.3390/pathogens12020154. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36839426/ .

Governo do Distrito Federal. Secretaria de Saúde do Distrito Federal/Subsecretaria de Vigilância á Saúde. Monitoramento da Sindrome Gripal e Sindrome Respiratoria Aguda Grave no Distrito Federal até a Semana Epidemiológica 52 de 2022. Disponível em: <https://www.saude.df.gov.br/documents/37101/0/BOLETIM_SE+52+

%281%29.pdf/c492643d-b123-ef43-e00f-7b18098f2dba? t=1680535372577 >

HASHEMIAN, S. M. R. et al. Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir): A new approach to Covid-19 therapy?. **Biomedecine & pharmacotherapy vol**. 162 (2023): 114367. doi:10.1016/j.biopha.2023.114367. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37018987/ .

KRUMBEIN, H. et al. “Respiratory viral co-infections in patients with COVID-19 and associated outcomes: A systematic review and meta-analysis.” Reviews in medical virology. **PUBMED**. vol. 33,1, 2023. e2365. doi:10.1002/rmv.2365. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35686619/ .

KUMAR, S. et al. “Oseltamivir analogs with potent anti-influenza virus activity.” **Drug discovery today,** vol. 25,8 (2020): 1389-1402. doi:10.1016/j.drudis.2020.06.004. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32554062/.

LI, M. et al. “COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects.” **Signal transduction and targeted therapy.** vol. 7,1 146. 3 May. 2022, doi:10.1038/s41392-022-00996-y. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35504917/.

MARTINELLO, F. Acurácia diagnóstica dos métodos sorológicos de detecção da COVID-19. 158. **RBAC**. 2021; 53(2):155-162. Disponível em: < 10.21877/2448-3877.202100966>

MENEZES, M.E.; LIMA, L.M. MARTINELLO. Diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). **RBAC**. 2020;52(2):122-30. Disponível em: < https://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2020/10/RBAC-vol-52-2- 2020-revista-completa-1.pdf#page=19 &gt

MORIYAMA, Miyu et al. “Seasonality of Respiratory Viral Infections.” **Annual review of virology,** vol. 7,1 (2020): 83-101. doi:10.1146/annurev-virology-012420-022445. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32196426/.

HAMID, Sarah et al. “Seasonality of Respiratory Syncytial Virus - United States, 2017-2023.” **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, vol. 72,14 355-361. 7 Apr. 2023, doi:10.15585/mmwr.mm7214a1. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37022977/.

OCHANI, R. K. et al. “COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management.” **Le infezioni in medicina**, vol. 29,1 (2021): 20-36. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33664170/.

SEEGENE, Inc. Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay República da Coreia, Seul, (2022): 1-10.

SULE, W. F.; OLUWAYELU, D. O. “Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects.” **The Pan African medical journal**, vol. 35, 121. 21 Jul.

2020, doi:10.11604/pamj.supp.2020.35.24258. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33282076/

VEROTTI, M. P. et al. Testes diagnósticos para COVID-19 registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária: sensibilidade e especificidade reportadas pelos fabricantes. **Com. Ciências Saúde**, 2020;31 Suppl 1:217-229. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/44223 >

YANG, M. et al. “Performance verification of five commercial RT-qPCR diagnostic kits for SARS-CoV-2.” Clinica chimica acta**. International journal of clinical chemistry** vol. 525 (2022): 46-53. doi:10.1016/j.cca.2021.12.004. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34902345/