

Implantação e otimização da PCR em tempo real para o diagnóstico da influenza A (H1N1) pandêmica no Instituto Adolfo Lutz e perspectivas para 2010

Implementation and optimization of real time PCR for diagnosis of pandemic influenza A (H1N1) at Instituto Adolfo Lutz and perspectives for 2010

RIALA6/1267

Lucila Okuyama FUKASAWA¹, Daniela Bernardes SILVA², Fabiana Cristina Pereira dos SANTOS², Isabel Takano OBA², Adele CATERINO-DE-ARAUJO¹, Maria Gisele GONÇALVES¹, Fábio HIGA¹, Maristela Marques SALGADO¹, Claudio Tavares SACCHI^{1*} e Grupo de Trabalho de Influenza A (H1N1) – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil**

**Grupo de Trabalho de Influenza A (H1N1) – Instituto Adolfo Lutz

Serviço de Virologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-907, fone: (11) 3068-2904. Adriana Luchs, Adriana Yurica, Akemi Suzuki, Ana Lucia C. Avelino, Ana Maria Sardinha, Ângela Spina, Antonio Erculiano Jr, Audrey Cilli, Bráulio C. Machado, Cecília L. Simões Santos, Cilene Proença, Claudia R. Gonçalves, Clovis Abe Constantino, Cristina A. Figueiredo, Daniela Bernardes Silva, Denise H. Russo, Edson A. Andrade, Eliana R. Souza, Elvira M.M. Nascimento, Fabiana C. P. Santos, Fabiana O. Burgos, Iray Rocco, Isabel T. Oba, Ivani B. Ferreira, João Leandro P. Ferreira, Jonas J. Kisielius, Juliana C. Pereira, Kátia O. Correa, Luiza T. Madia de Souza, Manoel N. Senna, Marcilio Figueiredo, Margarete Benega, Maria Akiko Ishida, Maria do Carmo S.T. Timenetsky, Maria Isabel Oliveira, Marli Ueda, Monica S. C. Pereira, Noemi N. Taniwaki, Norberto C. Campos, Norio A. Sasaki, Rita de C.C. Carmona, Samanta E. T. Borborema, Simone G. Morillo, Suely P. Curti, Teresa Keico N. Sugahara, Terezinha M. de Paiva

Serviço de Microbiologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-907, fone: (11) 3068-2899. Adele Caterino-de-Araujo, Carmen A. Freitas, Claudio T. Sacchi*, Daniela Leite, Fabio T. Higa, Lourdes R. A. Vaz Lima, Lucila O. Fukasawa, Maria Cândida de Souza, Maria Gisele Gonçalves, Maristela M. Salgado, Samanta C.G. Almeida

Divisão de Administração, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-907, fone: (11) 3068-2801. Claudia P. Saraceni, Eliana Gomes, Natalia N. Orico, Marta L. Salomão

Divisão de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-907, fone: (11) 3068-2876. Maria Lucia Mutagama e Equipe

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-907, fone: (11) 3068-2899, e-mail: ctsacchi@gmail.com

²Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-907, fone: (11) 3068-2904

Recebido: 16.03.2010 – Aceito para publicação: 30.03.2010

RESUMO

Os autores apresentam sua experiência no diagnóstico laboratorial de Influenza A (H1N1) em 37.240 amostras clínicas obtidas de pacientes com suspeita de gripe, encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz para análise. Eles apresentam os algoritmos de testes moleculares empregados, comparam a eficiência dos mesmos quanto à sensibilidade, especificidade e custo e, finalmente, sugerem um novo algoritmo para ser usado em caso de nova epidemia de Influenza A (H1N1) em 2010.

Palavras-chave. influenza A (H1N1), diagnóstico molecular, PCR em tempo real (rRT-PCR), algoritmo de testes moleculares.

ABSTRACT

The authors present their experience with the molecular diagnosis of Influenza A (H1N1) with 37.240 clinical samples obtained from individuals suspected of flu, sent to Instituto Adolfo Lutz for analysis. They show the used algorithms, compare their efficiency in terms of sensitivity, specificity and cost, and suggest a new algorithm to be employed in case of an outbreak of Influenza A (H1N1) in 2010.

Key words. influenza A (H1N1), molecular diagnosis, real time PCR (rRT-PCR), algorithms of molecular assays.

O vírus da influenza apresenta genoma de RNA de fita simples, segmentado, revestido por uma matriz proteica (M), apresenta envoltório lipídico e expressa na sua superfície duas glicoproteínas denominadas neuraminidase (NA) e hemaglutinina (HA), codificadas pelos genes da NA e HA, respectivamente. Em relação à glicoproteína de superfície HA, o vírus da influenza do tipo A se subdivide em 16 subtipos (H1 – H16) sendo os subtipos H1, H2 e H3, responsáveis pelas pandemias ocorridas no século XX; ainda neste século identificou-se infecção na espécie humana pelos subtipos H5, H7 e H9. Os genes NP e M determinam a classificação dos vírus da influenza em tipos A, B e C, sendo apenas o tipo A associado a episódios pandêmicos. De todas as combinações possíveis entre os subtipos HA e NA, apenas três foram reconhecidos como realmente adaptados à espécie humana: os subtipos H1N1, H2N2 e H3N2¹.

Em abril de 2009, um novo subtipo de vírus da influenza A, H1N1 de origem suína (A/H1N1), foi identificado em dois casos de infecção humana pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, EUA)². Rapidamente, novos casos foram diagnosticados com esse subtipo nos Estados Unidos, México, Canadá e outros países do mundo, levando a Organização Mundial da Saúde (OMS) a emitir um alerta de Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional^{3,4,5}.

No Brasil, apenas três Laboratórios de Saúde Pública, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (RJ), Instituto Evandro Chagas – IEC (PA) e Instituto Adolfo Lutz – IAL (SP) foram autorizados pelo Ministério da Saúde a realizar a PCR em tempo-real reversa (rRT-PCR) para o diagnóstico laboratorial confirmatório do vírus da influenza A (H1N1) de origem suína. Estes laboratórios fazem parte da rede de monitoramento do vírus influenza da Organização Mundial de Saúde (OMS) e são Laboratórios de Referência do Ministério da Saúde (MS) no Brasil em vírus respiratórios. A técnica de rRT-PCR foi padronizada e disponibilizada pelo CDC em 28 de abril de 2009⁶ e o IAL liberou seu primeiro laudo em 07 de maio de 2009.

Como laboratório de referência macrorregional, o IAL foi responsável pelo diagnóstico laboratorial da influenza dos Estados de São Paulo, Goiás, Tocantins, Piauí, Acre, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal, dos quais recebeu 37.240 amostras (32.488 de São Paulo e 4.752 dos demais Estados) para análise durante a onda epidêmica de 2009.

O diagnóstico laboratorial confirmatório da influenza A (H1N1) de origem suína foi realizado em

amostras de secreções respiratórias de casos suspeitos e de fragmentos de órgãos de óbitos, empregando-se a rRT-PCR. As amostras foram processadas para a extração dos ácidos nucleicos empregando-se o Kit QIAmp RNA Mini Prep (Qiagen) e os RNAs virais submetidos às reações de rRT-PCR.

O protocolo do CDC preconiza a realização de quatro reações separadas de rRT-PCR na mesma placa:

- (i) Reação InfA – detecta o gene M de influenza A universal
- (ii) Reação swInfA – detecta o gene NP de influenza A de origem suína
- (iii) Reação swH1 – detecta o gene HA específico para o A/H1N1 pandêmico
- (iv) Reação RNase P (RP) – detecta o gene da RNase P humana; atua como controle positivo da reação para indicar a extração adequada do ácido nucleico da amostra clínica.

Para cada uma destas quatro reações são empregados um par de iniciadores senso e antissenso e uma sonda marcada com o fluoróforo FAM. No ensaio, todas as amostras devem apresentar reação positiva para o gene da RNase P humana, indicando que o processo de coleta da amostra e extração do RNA foram adequados. Uma amostra é considerada positiva para o influenza A (H1N1) origem suína se for positiva nas quatro reações de rRT-PCR (InfA, swInfA, swH1 e RP).

Os primeiros casos de infecção humana causada pela influenza A (H1N1) origem suína no Estado de São Paulo foram confirmados na primeira semana do mês de maio de 2009^{7,8}. No início da epidemia, entre maio e junho de 2009, o IAL processou 2.610 amostras.

Empregando-se o protocolo do CDC, pode-se analisar 20 amostras por placa de reação, mais todos os controles negativos e positivos. O tempo de corrida das reações da rRT-PCR é de aproximadamente 90 minutos. Portanto, cada jornada de trabalho de 8 horas (um dia) permite cinco corridas de rRT-PCR e, conseqüentemente, a análise de 100 amostras por equipamento. No início da epidemia, onde tínhamos menor quantidade de amostras para analisar, o protocolo do CDC foi viável.

Entretanto, durante os meses de julho e agosto, no pico da epidemia da influenza A (H1N1), a demanda diária de amostras aumentou consideravelmente e chegamos a cadastrar em um único dia (06 de agosto) 1.111 amostras. Com esta demanda, o emprego do protocolo do CDC

para o processamento de todas estas amostras seria completamente inviável, considerando-se a estrutura e os recursos humanos de nosso laboratório. Exemplificando, para processarmos 1.000 amostras, empregando-se o protocolo do CDC e uma única máquina de rRT-PCR, seriam necessários 10 dias de trabalho, considerando-se uma carga horária diária de 8 horas.

Durante a primeira metade da epidemia, nós chegamos a utilizar três máquinas ao mesmo tempo aumentando nossa capacidade de processamento diário de amostras para 300/dia, um número inferior à média diária de amostras recebidas. Porém, com o contínuo aumento da demanda, acima de nossa capacidade analítica diária, houve um acúmulo de amostras a serem processadas que chegou a atingir 3.188 em um único dia.

Desta forma, a fim de aumentar a capacidade analítica de nosso laboratório, padronizamos ensaios multiplex de rRT-PCR para a detecção do A/H1N1. Neste novo formato, mais reações poderiam ser realizadas simultaneamente, pois duas reações diferentes estariam ocorrendo ao mesmo tempo em cada poço da placa. Duas reações em formato duplex foram padronizadas: Duplex 1 (InfA + RP) e Duplex 2 (swInfA + swH1) foram então desenvolvidas. As sequências dos iniciadores senso e antissenso e das sondas foram mantidas idênticas às do CDC, sendo alterado somente o fluoróforo das sondas RP e swInfA, de FAM para HEX, mantendo-se o quencher BHQ1. Assim, os ensaios desenvolvidos foram:

Duplex 1 – InfA-FAM + RP-HEX

Duplex 2 – swH1-FAM + swInfA-HEX

As duas reações duplex foram testadas em paralelo com as reações individuais (protocolo CDC) em 100 e 120 amostras previamente positivas ou negativas, respectivamente. O Duplex 1 (InfA + RP) apresentou a mesma sensibilidade e especificidade que as 2 reações individuais (InfA e RP), sendo que os valores de Ct obtidos nas reações duplex e individuais diferiram em no máximo ± 2 unidades. O mesmo ocorreu com o Duplex 2 (swInfA + swH1), entretanto a leitura e interpretação dos resultados do Duplex 2 ficaram difíceis, acarretando um aumento significativo no número de repetições.

Estes resultados não são totalmente inesperados, pois cada reação de rRT-PCR apresenta uma cinética diferente. Analisando-se as curvas de amplificação e de emissão de fluorescência de cada uma das quatro reações no formato original CDC, observamos que as reações para InfA e RP apresentaram melhor eficiência que as outras duas

reações (swInfA e swH1), o que poderia ser um dos fatores que contribuíram para os problemas de leitura e análise dos resultados obtidos com o Duplex 2 (swInfA + swH1). Desta forma, o uso do Duplex 2 não foi mantido em nossa rotina diagnóstica e ficou para ser futuramente otimizado.

Considerando-se os resultados expostos, decidimos adotar em nossa rotina apenas o Duplex 1 (InfA + RP), sendo as duas outras reações, para swInfA e swH1, mantidas no formato individual. Assim, no começo de julho de 2009, adotamos o algoritmo para o processamento das amostras descrito na Figura 1 (Protocolo IAL 2009).

A porcentagem de amostras analisadas com resultados negativos variou durante a onda epidêmica de 2009, mas em média, aproximadamente 50% de todas as amostras processadas foram negativas. Assim, adotamos uma triagem inicial, onde as amostras eram inicialmente submetidas ao Duplex 1 (InfA + RP). Todas as amostras processadas pelo Duplex 1 deveriam apresentar reação positiva para o componente RP, indicando a boa coleta do material clínico e o sucesso na extração do RNA viral. Caso contrário, essa amostra seria novamente submetida ao processo de extração. As amostras com resultado positivo para o RP, mas negativo para o InfA eram imediatamente liberadas como negativas para o influenza A (H1N1) de origem suína. Todas as amostras positivas para os dois genes, InfA e RP, eram então submetidas às duas reações individuais (swInfA e swH1). Caso a amostra fosse positiva para estes dois genes, a amostra era considerada positiva para a influenza A (H1N1) de origem suína. Se a amostra fosse negativa para estes mesmos genes, a amostra era caracterizada como positiva para influenza A universal (sazonal).

Empregando-se este novo protocolo (Protocolo IAL 2009), cada amostra foi submetida no máximo a apenas três reações de rRT-PCR (InfA + RP, swInfA e swH1), ao invés das quatro reações como no protocolo original do CDC. Além disso, empregando-se o esquema da triagem com o Duplex 1 (InfA + RP), em cada placa de 96 poços, foi possível analisar 91 amostras, ao invés das 20 amostras/placa pelo uso do protocolo CDC.

Durante o período de 27 de julho a 21 de agosto de 2009, foram processadas 12.226 amostras pelo Protocolo IAL 2009 (Tabela 1). Para isso, foram realizadas 24.452 reações de rRT-PCR, ou seja, 12.226 reações do Duplex 1 (InfA + RP) e, como aproximadamente 50% das amostras processadas pelo Duplex 1 (InfA + RP) foram negativas, apenas 6.113 reações de swInfA e swH1 foram realizadas. Comparativamente, com o protocolo CDC (quatro reações individuais) seriam necessárias 48.904 reações,

representando um número de testes 50% maior em relação ao Protocolo IAL 2009. Utilizando-se três equipamentos de RT-PCR, o processamento dessas amostras pelo Protocolo IAL 2009 demandou 20 dias de trabalho ao invés dos 41 dias que seriam necessários com a utilização do protocolo original CDC (Tabela 1).

A adoção do Protocolo IAL 2009 também representou uma redução de 50% em custos de insumos e de tempo de processamento das amostras em relação ao protocolo original CDC (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre o protocolo CDC e protocolo IAL no processamento de 12.226 amostras para o diagnóstico laboratorial da Influenza A (H1N1) por PCR em tempo real durante a onda epidêmica de 2009

	Protocolo CDC (4 reações)	Protocolo IAL 2009 (3 reações)	% de redução (-) com o uso do Protocolo IAL 2009
Nº Amostras	12.226	12.226	
Nº reações	12.226 (InfA) 12.226 (RP) 12.226 (swInfA) 12.226 (swH1) (Total = 48.904)	12.226 (InfA + RP) 6.113 (swInfA) 6.113 (swH1) (Total = 24.452)	- 50%
Reações/placa	80	80	
Nº placas	611	305	- 50%
Nº Placas/dia (8h) (3 máquinas)	15	15	
Tempo de trabalho	41 dias	20 dias	- 50%
Custo	R\$ 690.524,00	R\$ 345.262,00	-50 %

Esta estratégia permitiu que o nosso laboratório fosse capaz de processar uma grande quantidade de amostras, atendendo a toda a demanda diária com agilidade na liberação dos laudos, mantendo-se a estrutura física, o número de máquinas de RT-PCR, os recursos humanos e a carga horária de trabalho.

Para nos prepararmos para uma possível onda epidêmica de influenza em 2010, padronizamos um novo ensaio multiplex para a detecção simultânea da influenza A universal (InfA), da influenza B (InfB) e da Rnase P humana (RP). Este ensaio em formato triplex (InfA+InfB+RP), nada

mais é do que o Duplex 1 (InfA+RP) utilizado em 2009, adicionado dos iniciadores e sonda InfB (marcada com o fluoróforo Cy5). Adicionalmente, foi padronizado um terceiro ensaio duplex (Duplex 3 H1+H3), para a detecção dos subtipos H1 e H3 da influenza A humana na mesma reação, empregando-se a sonda para H1 marcada com FAM e a sonda para H3 com HEX. Ensaios preliminares demonstraram que os ensaios Triplex (InfA+InfB+RP) e o Duplex 3 (H1+H3) apresentaram sensibilidades e especificidades semelhantes às reações individuais.

Para o ano de 2010, nosso grupo tem a possibilidade de continuar a usar o Protocolo IAL 2009 ou uma modificação dele, onde o Duplex 1 (InfA+RP) poderá ser substituído pelo Triplex (InfA+InfB+RP) e as reações individuais para a subtipagem do influenza A sazonal substituídas pelo Duplex 3 (H1+H3) (Figura 1, Protocolo IAL 2010). Assim, todas as amostras serão, inicialmente, submetidas ao ensaio Triplex. Se a amostra for negativa para InfA e InfB e positiva para RP, a amostra será negativa. Se a amostra for apenas positiva para InfB e RP, será liberada com positiva para influenza B. As amostras positivas para InfA e RP serão submetidas às reações para swInfA e swH1 individuais. Sendo positivas nestas duas reações, serão liberadas como positivas para influenza A (H1N1) de origem suína. Se forem negativas, serão submetidas ao Duplex 3 (H1+H3), sendo liberadas como influenza A subtipo H1 ou H3. As principais vantagens do uso do Protocolo IAL 2010 em relação ao Protocolo IAL 2009 são otimização do uso da amostra extraída, redução ainda maior de custos e tempo de trabalho, pois, tanto a influenza A e B, ou os subtipos H1 e H3 de influenza A sazonal, são detectados simultaneamente.

Cabe salientar que estes novos ensaios multiplex foram desenvolvidos para a plataforma do equipamento de RT-PCR da Roche (LightCycler 480 II), a qual permite a utilização dos fluoróforos FAM, HEX e Cy5. Estes ensaios também foram testados no equipamento da Applied Biosystems (ABI) modelo 7300, mas a interpretação da reação com o fluoróforo HEX não foi satisfatória e a reação com Cy5 não é possível de ser feita no modelo ABI 7300; outros modelos devem ser avaliados. Desta forma, para a utilização destes ensaios multiplex nas máquinas ABI 7300, nós recomendamos a substituição do HEX por outro fluoróforo como o JOE.

Em 2010, o IAL está implantando o diagnóstico da influenza A (H1N1) origem suína em dois laboratórios regionais do IAL, que possibilitará maior rapidez no processamento de amostras do interior do Estado. Com

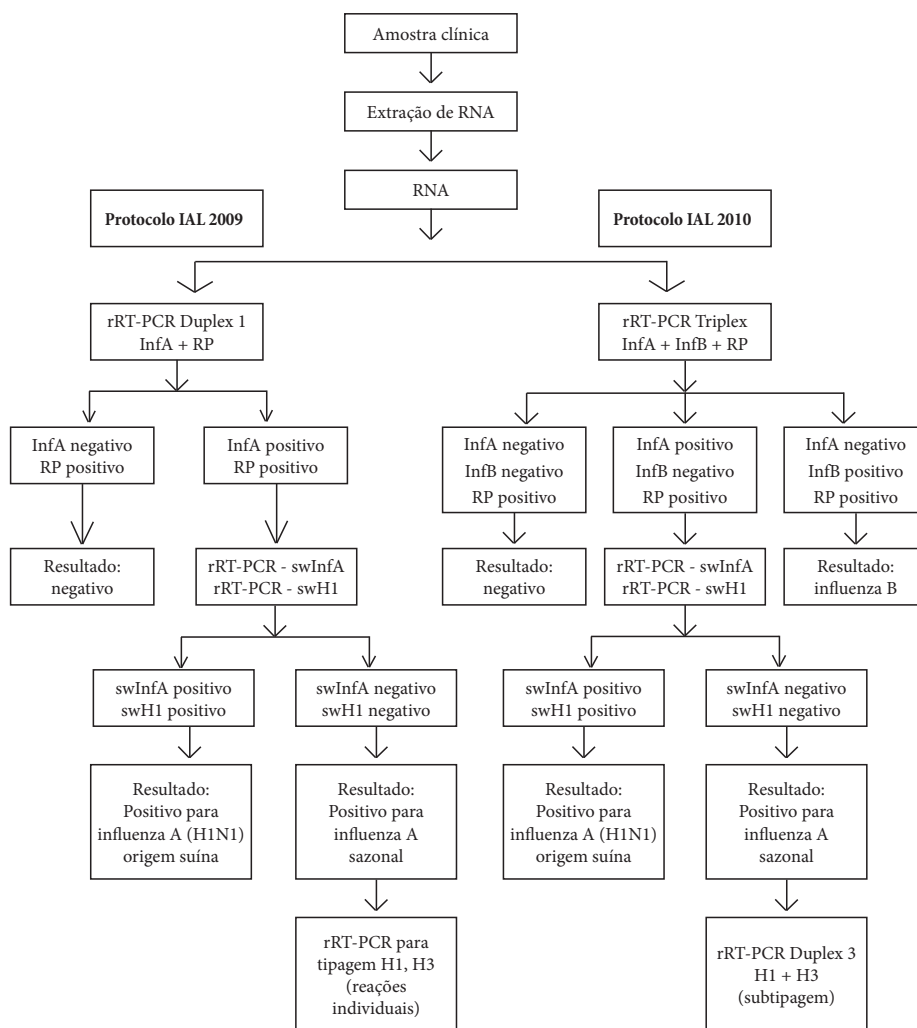


Figura 1. Algoritmo de processamento de amostras para o diagnóstico laboratorial de influenza por rRT-PCR – Protocolos IAL

a experiência adquirida durante a onda epidêmica de 2009, a descentralização do diagnóstico, a aquisição de novas máquinas, treinamento de novos profissionais e as modificações nos ensaios laboratoriais que fizemos, o IAL encontra-se em uma situação mais confortável em 2010, preparado para atender a demanda da próxima onda epidêmica de forma ainda mais eficiente.

REFERÊNCIAS

- Sullivan SJ, Jacobson RM, Dowdle WR, Poland GA. 2009 H1N1 Influenza. *Mayo Clin Proc*. 2010; 85(1):64-76.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). Swine influenza A (H1N1) infection in two children – Southern California, March–April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009; 58(15):400-2.
- Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*. 2009; 360:2605-15.
- World Health Organization. Current WHO phase of pandemic alert. World Health Organization website. Disponível em: [http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/phase/em].
- Fred J, Albernaz RM, Pellini ACG, Ribeiro AF, Carvalhanas TRMP, Yu AL et al. Vigilância da influenza A (H1N1), novo subtipo viral, no Estado de São Paulo, 2009. *BEPA*. 2009; 6(65):4-15.
- Center for Disease Control and Prevention – CDC. CDC Protocol for realtime RTPCR for influenza A (H1N1). [documento na internet]. Disponível em: [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf].
- Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Influenza A/H1N1 novo subtipo viral. *BEPA*. 2009; 6(66):17-23.
- Divisão de Biologia Médica. Instituto Adolfo Lutz. IAL isola estirpe brasileira do vírus influenza A/H1N1. *BEPA*. 2009; 6(66):24-5.