



ARTIGO ORIGINAL

Rapid antigen detection test for respiratory syncytial virus diagnosis as a diagnostic tool^{☆,☆☆}



Flávio da Silva Mesquita^a, Danielle Bruna Leal de Oliveira^{a,*}, Daniela Crema^b,
Célia Miranda Nunes Pinez^b, Thaís Cristina Colmanetti^a,
Luciano Matsumia Thomazelli^a, Alfredo Elias Gilio^c, Sandra Elisabeth Vieira^c,
Marina Baquerizo Martinez^{b,d}, Viviane Fongaro Botosso^e e Edison Luiz Durigon^a

^a Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, São Paulo, SP, Brasil

^b Universidade de São Paulo, Hospital Universitário, Laboratório Clínico, São Paulo, SP, Brasil

^c Universidade de São Paulo, Hospital Universitário, Divisão de Pediatria, São Paulo, SP, Brasil

^d Universidade de São Paulo, Escola de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, SP, Brasil

^e Instituto Butantan, Laboratório de Virologia, Divisão de Desenvolvimento Científico, São Paulo, SP, Brasil

Recebido em 26 de outubro de 2015; aceito em 19 de junho de 2016

KEYWORDS

Respiratory viruses;
Respiratory syncytial
virus – RSV;
Rapid antigen
detection test – RADT

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate the QuickVue[®] RSV Test Kit (QUIDEL Corp, CA, USA) as a screening tool for respiratory syncytial virus in children with acute respiratory disease in comparison with the indirect immunofluorescence assay as gold standard. In Brazil, rapid antigen detection tests for respiratory syncytial virus are not routinely utilized as a diagnostic tool, except for the diagnosis of dengue and influenza.

Methods: The authors retrospectively analyzed 486 nasopharyngeal aspirate samples from children under age 5 with acute respiratory infection, between December 2013 and August 2014, the samples were analyzed by IFI and QuickVue[®] RSV Test kit. Samples with discordant results were analyzed by RT-qPCR and nucleotide sequencing.

Results: From 313 positive samples by immunofluorescence assays, 282 (90%) were also positive by the rapid antigen detection test, two were positive only by rapid antigen detection test, 33 were positive only by immunofluorescence assays, and 171 were positive by both methods. The 35 samples with discordant results were analyzed by RT-qPCR; the two samples positive only by rapid antigen detection test and the five positive only by immunofluorescence assays were also positive by RT-qPCR. There was no relation between the negativity by QuickVue[®] RSV Test and viral load or specific strain. The QuickVue[®] RSV Test showed sensitivity of 90%, specificity of 98.8%, PPV of 99.3%, and negative predictive value of 94.6%, with accuracy of 93.2% and agreement κ index of 0.85 in comparison to IFA.

DOI se refere ao artigo:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2016.06.013>

[☆] Como citar este artigo: Mesquita FS, Oliveira DB, Crema D, Pinez CM, Colmanetti TC, Thomazelli LM, et al. Rapid antigen detection test for respiratory syncytial virus diagnosis as a diagnostic tool. J Pediatr (Rio J). 2017;93:246–52.

^{☆☆} Trabalho desenvolvido na Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas II, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: danibruna@gmail.com (D.B. Oliveira).

PALAVRAS-CHAVE

Viroses Respiratórias;
Vírus Sincicial
Respiratório – VSR;
Teste Rápido de
Detecção de
Antígeno – TRDA

Conclusões: This study demonstrated that the QuickVue® RSV Test Kit can be effective in early detection of Respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirate and is reliable for use as a diagnostic tool in pediatrics.

© 2016 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Teste rápido de detecção de antígenos para o diagnóstico do Vírus Sincicial Respiratório como ferramenta de diagnóstico

Resumo

Objetivo: Avaliar o teste QuickVue® RSV Test Kit (QUIDEL Corp, CA, EUA) para o diagnóstico rápido do vírus sincicial respiratório em crianças com doença respiratória aguda, comparando com a imunofluorescência indireta como padrão ouro. Visto que, no Brasil, testes rápidos para detecção de antígenos para vírus sincicial respiratório não são rotineiramente utilizados como ferramenta de diagnóstico, exceto para Dengue e Influenza.

Métodos: Um total de 486 amostras de aspirado de nasofaringe de crianças menores de 5 anos com doença respiratória aguda, coletadas entre dezembro de 2013 e agosto de 2014, foram analisadas por imunofluorescência e pelo teste QuickVue®. Amostras com resultados discordantes entre os métodos foram submetidas a PCR em tempo real e sequenciamento.

Resultados: Das 313 amostras positivas por IFI, 282 foram positivas no teste rápido (90%), 2 amostras foram positivas apenas no teste rápido (0.6%), 33 apenas na imunofluorescência (10.5%) e 171 foram negativas em ambos os métodos. As 35 amostras com resultados discordantes foram testadas por PCR em tempo real, sendo que duas que foram positivas apenas no teste rápido e 5 apenas na imunofluorescência confirmaram-se positivas. Não houve relação entre a ausência de positividade no teste QuickVue® com a carga ou com a cepa viral. O teste QuickVue® mostrou sensibilidade de 90.1%, especificidade 98.9%, valor preditivo positivo 99.3%, valor preditivo negativo de 94.6%, acurácia de 93.2% e índice de concordância de 0.85 em comparação à imunofluorescência.

Conclusões: Nosso estudo demonstrou que o teste QuickVue® RSV pode ser efetivo na detecção precoce do vírus sincicial respiratório em amostras de aspirado de nasofaringe e é confiável como uma ferramenta de diagnósticos em pediatria.

© 2016 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

O vírus sincicial respiratório (VSR) é conhecido como um importante agente infeccioso de infecções do trato respiratório em crianças em todo o mundo.¹ A maior parte das crianças é infectada no primeiro ano de vida, porém praticamente todas estarão expostas até os 2 anos.² Reinfecções são comuns ao longo da vida, dependem do nível de anticorpos neutralizadores no soro, porém complicações em infecções do trato respiratório inferior são mais comuns na infecção primária.³ O VSR é basicamente reproduzido em partes superficiais do trato respiratório até se espalhar pelo epitélio e formar um efeito citopático semelhante a um sincício. O VSR tem dois subgrupos conhecidos, A e B, e pode causar vários quadros clínicos, desde uma gripe comum a bronquiolite e pneumonia, causadas pela necrose dos brônquios e bronquíolos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que o VSR infecta 64 milhões de pessoas e causa 160.000 óbitos por ano em todo o mundo.⁴ A sazonalidade do vírus varia e normalmente é detectada durante todo o ano. Contudo, sabe-se que a maior incidência ocorre no inverno.

O diagnóstico viral do VSR pode ser atingido por vários métodos, incluindo: cultura de células, ensaios de imunofluorescência (IFI), ensaios imunocromatográficos (testes rápidos de detecção de antígenos: TRDAs) e reação em cadeia da polimerase (PCR), incluindo ensaios de PCR convencionais e em tempo real. Na última década, os métodos moleculares são usados como padrão ouro devido à sua especificidade e capacidade de detecção simultânea de diferentes vírus.⁵ No Brasil, embora existam no mínimo quatro testes rápidos de detecção de antígenos (TRDAs) disponíveis para a detecção do VSR: BD-Directigen™EZ-RSV (Becton, Dickinson and Company®, NJ, EUA); SASTM RSVAlert (Medivax®, RJ, Brasil), Alere™BinaxNow®RSV (Alere™, EUA) e QuickVue® RSV Test Kit (QUIDEL Corp., CA, EUA), testes rápidos não são usados rotineiramente no país como diagnóstico confiável de infecções virais, como o VSR, com exceção dos testes de HIV e Dengue,^{6,7} que são amplamente usados.

O teste rápido a ser avaliado neste estudo (QuickVue® RSV Test Kit, Quidel®) fornece resultado em 15 minutos, em comparação com aproximadamente 90 minutos do teste convencional IFI e 2-3 horas do ensaio imunossorvente ligado a enzima (Elisa).⁸ Identificar rapidamente o agente

etiológico das doenças respiratórias, como bronquite e bronquiolite, é um passo importante em direção à redução do uso de antimicrobianos, principalmente em crianças hospitalizadas,⁹ e também pode levar ao método mais adequado de isolamento e tratamento.

O Quidel® QuickVue® RSV Test é um imunoenensaio com varetas que permite a detecção rápida e qualitativa do antígeno VSR (proteína de fusão viral) diretamente a partir de espécimes de esfregaço de nasofaringe, aspirado de nasofaringe ou lavagem nasal/nasofaríngea de pacientes pediátricos sintomáticos. O teste é destinado ao uso como auxílio no diagnóstico de infecções virais sinciciais respiratórias agudas.

O objetivo deste estudo é avaliar a sensibilidade, especificidade e importância do teste QuickVue® RSV Test Kit (QUIDEL Corp.CA, EUA) como um teste rápido de detecção de antígenos (TRDA) para exame e melhoria do diagnóstico do vírus sincicial respiratório (VSR) em aspirado de nasofaringe em crianças com doença respiratória aguda em comparação com ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) para uso em hospitais e clínicas pediátricas.

Material e métodos

Analisamos retroativamente amostras de aspirado de nasofaringe (AN) de 486 crianças – 274 meninos (56,4%) e 212 meninas (43,6%) – com menos de 5 anos com sintomas de infecção respiratória aguda (IRA), incluindo a doença do trato respiratório superior e inferior, entre dezembro de 2013 e agosto de 2014, que apresentavam IRA e foram atendidas no pronto socorro, no ambulatório ou internadas na Pediatria do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP).

As amostras clínicas foram coletadas durante o surto de VSR de 2014 com aspirador nasal. Imediatamente após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório Hospitalar da Universidade de São Paulo e examinadas por ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) com o *kit* comercial Light Diagnostics™ Respiratory Panel Viral Screening and Identification (IFA Chemicon®, Merck Millipore Corp., EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Essas amostras foram enviadas ao Laboratório de Virologia Clínica e Molecular no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, onde foram congeladas por criogenia e armazenadas a -80 °C até o momento do teste. Todas as amostras foram registradas no Biorrepositório do Laboratório de Virologia e todas as diretrizes de ética para experimentos humanos foram estritamente observadas e aprovadas pelo Comitê de Ética sobre Pesquisa com Seres Humanos da Universidade de São Paulo (USP).

Com base nos resultados da IFI, foram selecionadas 486 amostras de AN distribuídas durante todos os meses da temporada e corresponderam a 50,4% de todas as amostras analisadas. Elas foram classificadas em três grupos distintos conforme mostrado na [figura 1](#). Para reduzir ou eliminar qualquer viés, o ensaio QuickVue® RSV foi feito e analisado em um período cego de teste e os resultados foram comparados com os resultados originais do Kit IFI.

Para confirmar os resultados, as amostras com resultados discrepantes foram testadas posteriormente por PCR da Transcrição Reversa Quantitativa em Tempo Real (região da

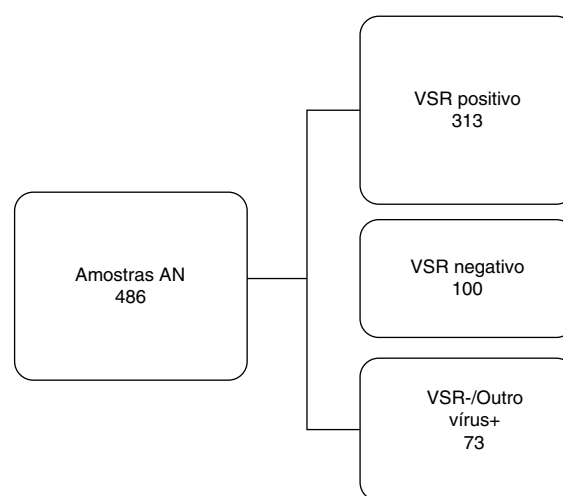


Figura 1 Fluxograma de trabalho. As amostras de aspirado de nasofaringe foram divididas em três grupos diferentes examinados pelo ensaio de imunofluorescência e comparadas com o teste rápido de detecção de antígenos para o vírus sincicial respiratório. VSR, vírus sincicial respiratório; AN, aspirado de nasofaringe; +, positivo; -, negativo.

proteína F) e por PCR tradicional (regiões das proteínas G e F).

As amostras foram extraídas na plataforma Nuclisens® easyMag® (bioMérieux®, MA, EUA) e a PCR em tempo real foi feita em uma instrumentação ABI 7300 com o *kit* principal de mistura AgPath-ID One-Step RT-PCR (Ambion®, TX, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Na PCR tradicional, usamos uma mistura de reação com 10 µL de DNA complementar (cDNA), 5 µL de reação colchão de PCR com concentração 10X [50 mM Tris-HCl (pH 9,0)], 1 µL de MgCl₂ [50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄], 2,5 mM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP), 10 pmol de cada iniciador para VSR ([tabela 1](#)), 0,6U de Taq DNA polimerase (taq DNA polimerase platina, Invitrogen, CA, EUA) e Água, resultou em um volume final de 50 µL. A amplificação das proteínas G e F foi feita em um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Inc., CA, EUA) de acordo com a seguinte programação: 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e um último ciclo de 72 °C por 7 minutos. Aproximadamente 1.894 produtos de pares de base (bp) do gene G¹⁰⁻¹² e 1685 produtos bp do gene F¹³ foram purificados com um *kit* comercial (Exosap, GE®Tech, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As reações em sequência do gene G¹⁰⁻¹³ e do gene F^{13,14} foram submetidas à separação eletroforética para coleta de dados básicos em um sequenciador de DNA 3130 (Applied Biosystems, Inc., CA, EUA) com um *kit* de finalizadores com corante fluorescente (Applied Biosystems, Inc.CA, EUA). As sequências obtidas foram editadas com a versão 1.0 do programa de navegador de sequências (Applied Biosystems, Inc., CA, EUA) e alinhadas com o programa Megalign (Lacergene, DNA STAR, Inc., WI, EUA). A filogenia por máxima verossimilhança da proteína G foi estimada com o MEGA 6 (Análise da Genética Evolutiva Molecular)^{15,16} com distribuição Gama (TN93 + G) para o conjunto de dados RSV_A e o modelo com distribuição gama (HKY + G) para o

Tabela 1 Iniciadores usados na PCR tradicional e no sequenciamento das proteínas G e F do VSR

Nome do iniciador	Proteína-alvo	Posição no genoma	Reação	Sequência 5'-3'	Referência
FV ^a _AB	G	186-163/Gene F	PCR	GTTATGACACTGGTATACCAACC	Zheng et al., 1996 ¹⁰
SH+ _AB	G	3924-3948/ Gene M	PCR	CAGCTACACGTTTTTCAATCAAACC	Lima et al., 2012 ¹¹
OG1 + _21 ^a	G	1 - 21/ Gene G	SANGER	GGGGCAAATGCAACCATGTCC	Trento et al., 2015 ¹²
GAB + ^{a,b}	G/F	504 - 524/ Gene G	PCR	YCAITTTGAAGTGTTCACACTT	Peret et al., 2000 ¹³
BO2 -_AB ^b	F	1216 - 1199/Gene F	PCR	ATCTGTTTTTGAAGTCAT	Arbiza J ^c
F1AB + ^b	F	3 - 22/ Gene F	SANGER	GGTTGGTATACCAGTGTCAATAC	Modif. Peret et al., 1998 ¹⁴
FP2 +_AB ^b	F	573 - 595/ Gene F	SANGER	TTAACCAGCAAAGTGTAGACC	In House

F, Proteína de fusão; G, Glicoproteína; M, Proteína de matriz.

^a Iniciador usado no sequenciamento do gene G.

^b Iniciador usado no sequenciamento do gene F.

^c Cortesia do Dr. Juan Arbiza, Laboratório de Virologia, Faculdade de Ciências, Universidade da República, Montevideu, Uruguai.

conjunto de dados VSRHB.¹⁷ A árvore filogenética resultante foi traduzida em um cladograma vertical.

Os critérios usados na avaliação de desempenho do ensaio com QuickVue[®] RSV foram sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e razões de verossimilhança de diagnóstico (DLRs) positivas/negativas.^{18,19} Consideramos o IFI o padrão ouro nessas análises. As amostras avaliadas como positivas pelo IFI foram consideradas verdadeiros positivos e as amostras avaliadas como negativas pelo IFI foram consideradas verdadeiros negativos. Para uma avaliação precisa da concordância entre os métodos, também foi calculado o índice kappa (κ).

Resultados

Teste rápido de detecção de antígenos (TRDA)

Das 313 amostras de AN positivas para VSR pelo IFI, 282 (90%) também foram positivas de acordo com o teste rápido (Quidel[®] QuickVue RSV Test); assim, o TRDA revelou 31 resultados falso negativos. Todas as 100 amostras de AN positivas para VSR pelo IFI também foram consideradas negativas pelo teste rápido (100%). Das 73 amostras de AN consideradas negativas para VSR, porém positivas para outros vírus respiratórios (adenovírus (AdV) ou vírus da parainfluenza (PIV) 1, 2, 3 ou influenza A e influenza B) pelo IFI, 71 (97,26%) foram confirmadas pelo teste rápido e duas (2,74%) apresentaram resultados divergentes, revelaram dois resultados falso positivos (tabela 2A).

Resultados discrepantes testados por PCR em tempo real

As 33 amostras com resultados discordantes entre os dois métodos foram analisadas por PCR em tempo real (tabela 2B).

Vinte e seis amostras de AN previamente consideradas positivas pelo IFI e negativas pelo teste rápido foram confirmadas positivas para VSR por PCR em tempo real. As duas

amostras de AN consideradas negativas pelo IFI e positivas pelo teste rápido eram de fato positivas por PCRq. E as cinco amostras de AN consideradas positivas pelo IFI e negativas pelo teste rápido eram de fato negativas por PCRq. Os

Tabela 2 Resultados de VSR positivos e negativos por ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) e teste rápido de detecção de antígenos (TRDA) e totalidade de amostras divergentes testadas neste estudo. (A) Resultados do teste rápido de detecção de antígenos comparados com os do IFI. (B) Resultados discrepantes. (C) Comparação dos parâmetros de avaliação do teste rápido, incluindo sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e razão de verossimilhança de diagnóstico positivo/negativo (DLR) do QuickVue[®] RSV Test em comparação com o IFI, usado como padrão ouro

TRDA (teste)	Número de amostras		Total
	IFI (padrão ouro)		
	Positivo	Negativo	
Positivo	282	2	284
Negativo	31	171	202
Total	313	173	486
Resultados	Número de amostras		
IFI+, TRDA -, qPCR+	26		
IFI-, TRDA+, qPCR+	2		
IFI+, TRDA-, qPCR-	5		
IFI-, TRDA+, qPCR-	0		
Parâmetro	IC de 95%		
Sensibilidade (%)	90,1 (86,8-93,4%)		
Especificidade (%)	98,8 (97,2-100)		
VPP (%)	99,3 (98,3-100%)		
VPN (%)	94,6 (79,6-89,6)		
DLR positivo	77,9 (19,6-309,26)		
DLR negativo	0,1 (0,071-0,14)		

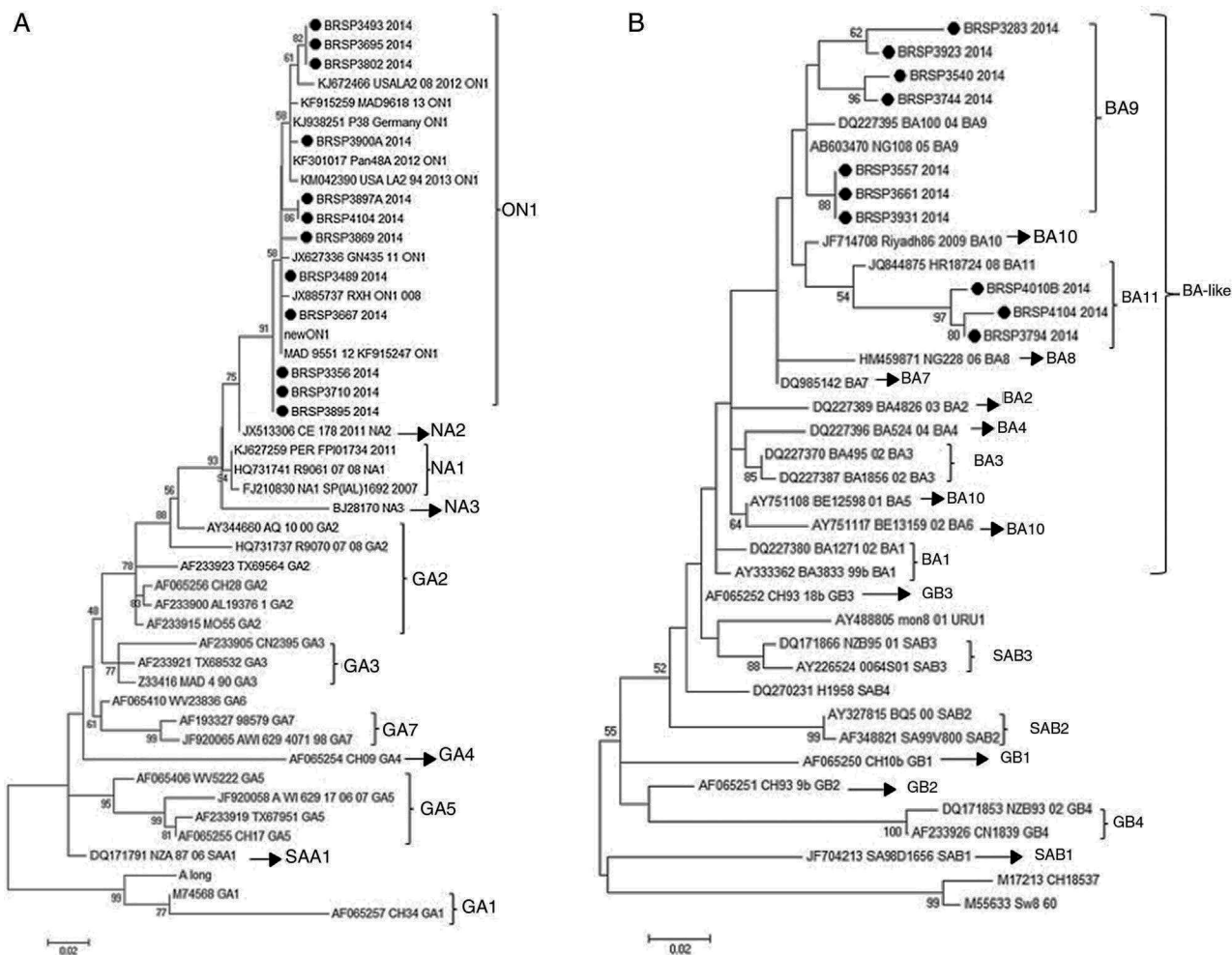


Figura 2 Árvore filogenética da máxima verossimilhança do VSRH com base nas sequências do nucleotídeo da proteína G das amostras discrepantes deste trabalho, indicadas como BRSP, e de cepas mundialmente distribuídas obtidas do GenBank. Os números de acesso ao GenBank são apresentados em cada táxon, seguidos pelo nome correspondente da cepa. A(s) árvore(s) inicial(is) da busca heurística foi(ram) obtida(s) com o método de agrupamento de vizinhos a uma matriz de distâncias pareadas estimadas pela abordagem de máxima verossimilhança composta (MCL). As árvores foram desenhadas em escala, com os comprimentos dos troncos mensurados em número de substituições por local. Os números nos nós internos representam as probabilidades *bootstrap* (5.000 réplicas). Somente valores de *bootstrap* > 50 são apresentados. A) VSRHA. O histórico de evolução foi inferido com o método de máxima verossimilhança com base no modelo de Tamura-Nei.^{15,16} A árvore com a maior probabilidade logarítmica (-1303.6711) é apresentada. B) VSRHB. O histórico de evolução foi inferido com o método de máxima verossimilhança com base no modelo de Hasegawa-Kishino-Yano.¹⁷ A árvore com a maior probabilidade logarítmica (-1207.4096) é apresentada. As análises foram feitas no MEGA6.¹⁵

valores do ciclo de limiar (*Ct*) do PCR em tempo real das 26 amostras positivas variou de 14 a 37 ciclos.

Para entender se as diferenças entre os testes estavam relacionadas a um genótipo específico (VSR.A ou VSR.B) ou a uma variabilidade genética na proteína F do vírus, a proteína G de todas as 26 amostras com resultados divergentes foram sequenciadas e tivemos 22 consensos para análise posterior. Depois do sequenciamento, os resultados mostraram que todas as 12 sequências VSR.A são do genótipo novo ON1 e todas as 10 sequências VSR.B são dos genótipos novos BA11 (3) e BA9 (7) (fig. 2).

Para verificar se a negatividade no TRDA de amostras positivas com alta carga viral estava associada a uma mutação específica na fusão (F) da proteína de VSR, os

primeiros 1200 nucleotídeos do gene das 26 amostras com resultados divergentes foram sequenciados e não revelaram uma mutação específica que poderia ser associada à negatividade das amostras no TRDA (dados não apresentados).

Análise estatística

A feitura do QuickVue® RSV Test em comparação com o IFI está representada na tabela 2C. A acurácia foi de 93,2 (IC de 95%, 91,0%-95,4%) e a concordância do índice κ entre os métodos foi de 0,85 (IC de 95%, 0,945-0,796) e foi classificada como quase perfeita²⁰ e $p < 0,001$.

A análise dos resultados discordantes e concordantes entre as metodologias não mostrou relevância ($p=0,62$, $p=0,065$ no qui-quadrado, respectivamente).

Discussão

O objetivo deste estudo foi provar que o teste rápido é eficiente para detecção de VSR e incentivar seu uso no Brasil, já que é atualmente feito para dengue, gripe e HIV.

A marca registrada da infecção por VSR é a bronquiolite,²¹ e seu diagnóstico normalmente é feito pelo quadro clínico.²² Embora não recomendada, a prescrição de antibióticos para bronquiolite é uma prática extremamente comum em crianças internadas^{9,23} e seu uso está associado a um aumento no custo e tempo de internação²⁴ e a um aumento do risco de desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes.²⁵ Em casos graves, principalmente nas unidades de terapia intensiva, antibióticos são comumente usados para evitar uma possível infecção bacteriana, apesar de o risco em neonatos saudáveis ser incomum.²⁶ Uma análise sistemática de quatro estudos que envolveram crianças na emergência sugeriu que testes de diagnóstico podem reduzir a prescrição de antibióticos,²⁴ conforme verificado em um estudo com neonatos com menos de 1 ano internados com bronquiolite positivos para VSR pelo IFI, que descreveu uma redução significativa no uso de antibióticos.²⁷ Caso o teste diagnóstico seja positivo, ele pode contribuir para evitar o uso de antibióticos. Em casos duvidosos, embora não graves, o paciente deve ficar em observação.

Como o resultado que usa um teste rápido está disponível em 15 minutos e é feito pelo médico sem a necessidade de equipamentos laboratoriais, o teste rápido seria usado para esse exame, como um ponto de cuidado.

Nesse contexto, nosso trabalho mostrou que o QuickVue® RSV Test é confiável para essa tarefa, como pode ser visto pelos resultados do desempenho em comparação com os ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) usados como padrão ouro neste estudo. Todos os parâmetros analisados eram altos (acima de 90% – Sensibilidade de 90%, especificidade de 98,8%, VPP de 99,3% e VPN de 94,6%) e semelhantes aos de outros estudos que compararam o TRDA com IFI como padrão ouro, que variou de 73 a 93% de sensibilidade e 84 a 100% de especificidade.²⁸ Em contrapartida, Leonardi et al.,²⁹ avaliaram quatro ensaios diretos de detecção de antígeno VSR e seus resultados apresentaram apenas 57,5% de sensibilidade para QuickVue®, embora essa diferença possa ser devida à comparação com RT-qPCR, que tem uma sensibilidade e especificidade maiores do que o IFI.

Além disso, a concordância geral (índice kappa) e a acurácia entre os dois testes foram consideradas boas e a concordância percentual negativa e positiva (173/202 e 284/313, respectivamente) não apresentou diferença significativa ($p>0,05$). Somente 33 amostras apresentaram resultados divergentes entre os testes, foram analisadas por RT-qPCR para confirmar os resultados e correlacionar a sensibilidade do teste com baixa carga viral, como visto em Tuttle et al.³⁰ Vinte e seis amostras continuam não resolvidas após essa análise e também não conseguimos explicar as diferenças de carga viral, pois o ciclo de limiar do qPCR variou de 14 a 37. Talvez esses resultados falso negativos

possam estar relacionados ao armazenamento de espécimes congelados antes de sua análise.

Depois, para entender se essas diferenças estavam relacionadas a um genótipo específico (RSV_A ou RSV_B) ou a uma variabilidade genética na proteína F do vírus, foram sequenciados os genes G e F. A análise das sequências de G mostrou que elas pertenciam aos genótipos ON1 e BA como inserção (variantes BA11 e BA9). Contudo, outras amostras deste estudo que apresentaram resultados positivos pelo QuickVue® RSV Test foram sequenciadas (dados não apresentados) e pertenciam aos mesmos genótipos, provaram que a negatividade não está relacionada a esses genótipos. Não identificamos mutação no gene F que poderia ser responsável pelos resultados. Nossa abordagem final buscou a inibição causada pelos elementos químicos nas amostras, porém os espécimes falso negativos foram diluídos (1:5 e 1:10) e continuaram negativos.

Concluindo, o QuickVue® RSV Test Kit (Quidel Corp.CA, EUA) apresentou altos valores preditivos e razões de verossimilhança e provou ser eficaz na detecção precoce do vírus sincicial respiratório. Contudo, a depender da melhoria do paciente, recomendamos que o teste seja repetido em caso de negatividade. Portanto, nosso estudo demonstrou que o QuickVue® RSV Test Kit (Quidel Corp.CA, EUA) pode ser eficaz na detecção precoce do vírus sincicial respiratório em espécimes congelados de aspirado da nasofaringe e é adequado para uso como ferramenta de diagnóstico em crianças.

Financiamento

Universidade de São Paulo (USP).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

À Quidel Corp. por doar os kits do teste rápido de detecção de antígenos, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. A Gustavo Rezende Melo pela análise estatística e ao Sr. José Maria Lopes pelo apoio técnico.

Referências

1. Domachowske JB, Rosenberg HF. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:298–309.
2. Mohapatra SS, Boyapalle S. Epidemiologic, experimental, and clinical links between respiratory syncytial virus infection and asthma. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:495–504.
3. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child.* 1986;140:543–6.
4. Openshaw PJ. Potential therapeutic implications of new insights into respiratory syncytial virus disease. *Respir Res.* 2002;3:S15–20.
5. Pecchini R, Berezin EN, Felício MC, Passos SD, Souza MC, Lima LR, et al. Incidence and clinical characteristics of the infection by the respiratory syncytial virus in children admit-

- ted in Santa Casa de São Paulo Hospital. *Braz J Infect Dis*. 2008;12:476–9.
6. Ferreira Junior OC, Ferreira C, Riedel M, Widolin MR, Barbosa-Júnior A, HIV Rapid Test Study Group. Evaluation of rapid tests for anti-HIV detection in Brazil. *Aids*. 2005;19:S70–5.
 7. Lima Mda R, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e738.
 8. Ray CG, Minnich LL. Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses. *J Clin Microbiol*. 1987;25:355–7.
 9. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics*. 2006;118:1774–93.
 10. Zheng H, Peret TC, Randolph VB, Crowley JC, Anderson LJ. Strain-specific reverse transcriptase PCR assay: means to distinguish candidate vaccine from wild-type strains of respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol*. 1996;34:334–7.
 11. Lima HN, Botosso VF, Oliveira DB, Campos AC, Leal AL, Silva TS, et al. Molecular epidemiology of the SH (small hydrophobic) gene of human respiratory syncytial virus (HRSV), over 2 consecutive years. *Virus Res*. 2012;163:82–6.
 12. Trento A, Ábrego L, Rodríguez-Fernández R, González-Sánchez MI, González-Martínez F, Delfraro A, et al. Conservation of g-protein epitopes in respiratory syncytial virus (group A) despite broad genetic diversity: is antibody selection involved in virus evolution? *J Virol*. 2015;89:7776–85.
 13. Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, et al. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis*. 2000;181:1891–6.
 14. Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol*. 1998;79:2221–9.
 15. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30:2725–9.
 16. Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York, USA: Oxford University Press; 2000.
 17. Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*. 1985;22:160–74.
 18. MacKinnon DP, Krull JL, Lockwood CM. Equivalence of the mediation, confounding and suppression effect. *Prev Sci*. 2000;1:173–81.
 19. Altman DG, Bland JM. Quartiles, quintiles, centiles, and other quantiles. *BMJ*. 1994;309:996.
 20. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:159–74.
 21. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980–1996. *JAMA*. 1999;282:1440–6.
 22. Zorc JJ, Hall CB. Bronchiolitis: recent evidence on diagnosis and management. *Pediatrics*. 2010;125:342–9.
 23. Christakis DA, Cowan CA, Garrison MM, Molteni R, Marcuse E, Zerr DM. Variation in inpatient diagnostic testing and management of bronchiolitis. *Pediatrics*. 2005;115:878–84.
 24. Doan Q, Enarson P, Kissoon N, Klassen TP, Johnson DW. Rapid viral diagnosis for acute febrile respiratory illness in children in the Emergency Department. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;5:CD006452.
 25. Wang EE, Einarson TR, Kellner JD, Conly JM. Antibiotic prescribing for Canadian preschool children: evidence of over-prescribing for viral respiratory infections. *Clin Infect Dis*. 1999;29:155–60.
 26. Randolph AG, Reder L, Englund JA. Risk of bacterial infection in previously healthy respiratory syncytial virus-infected young children admitted to the intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:990–4.
 27. Ferronato ÂE, Gilio AE, Ferraro AA, Paulis MD, Vieira SE. Etiological diagnosis reduces the use of antibiotics in infants with bronchiolitis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67:1001–6.
 28. Chartrand C, Tremblay N, Renaud C, Papenburg J. Diagnostic accuracy of rapid antigen detection tests for respiratory syncytial virus infection: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2015;53:3738–49.
 29. Leonardi GP, Wilson AM, Dauz M, Zuretti AR. Evaluation of respiratory syncytial virus (RSV) direct antigen detection assays for use in point-of-care testing. *J Virol Methods*. 2015;213:131–4.
 30. Tuttle R, Weick A, Schwarz WS, Chen X, Obermeier P, Seeber L, et al. Evaluation of novel second-generation RSV and influenza rapid tests at the point of care. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;81:171–6.