Luciano Matsumiya Thomazelli

**VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE VÍRUS RESPIRÁTORIOS HUMANOS
EM AMOSTRAS CLÍNICAS PELA TÉCNICA DE GENESCAN-RT-PCR.**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração:
Microbiologia

Orientador:
Prof. Dr. Edison Luis Durigon

São Paulo
2004

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

RUBENS THOMAZELLI (in memoriam) e
TERUMI MATSUMIYA THOMAZELLI
pelo incentivo e oportunidades
proporcionadas.

"Autobiografia em Cinco Capítulos"

- 1) Ando pela rua
Há um buraco fundo na calçada
Eu caio
Estou perdido... sem esperança.
Não é culpa minha.
Leva uma eternidade para encontrar a saída.
- 2) Ando pela mesma rua.
Há um buraco fundo na calçada
Mas finjo não vê-lo.
Caio nele de novo.
Não posso acreditar que estou no mesmo lugar.
Mas não é culpa minha.
Ainda assim leva um tempão para sair.
- 3) Ando pela mesma rua.
Há um buraco fundo na calçada
Vejo que ele ali está
Ainda assim caio... é um hábito.
Meus olhos se abrem
Sei onde estou
É minha culpa.
Saio imediatamente
- 4) Ando pela mesma rua
Há um buraco fundo na calçada
Dou a volta.
- 5) Ando por outra rua.

Portia Nelson

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, pelo incentivo e apoio constantes no desenvolvimento da minha carreira universitária, que além de orientar é um grande amigo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro desde a minha graduação.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, que são tantos que seria difícil nomeá-los e que tornaram a execução deste trabalho ainda mais agradável.

À toda equipe de HRSV que tornaram este trabalho possível: Andrea L. Leal, Claudia T. Pedroso, Danila Vedovello, Larissa M. B. do Amaral e Thereza S. Silva

Aos funcionários do ICB-II da USP, José Maria Lopez e Fabiana da Silveira pelo suporte técnico durante a execução desse trabalho.

Aos colegas e ex-colegas de pós-graduação que me deram algo em que me espelhar, em especial, Maria Luisa Barbosa, Vanessa Naomi Takahashi, Viviane Botosso, Danielle B.L. de Oliveira e César Augusto Dinóla Pereira.

Aos professores Dra. Charlotte Marianna Hársi, Dra. Dolores Ursula Mehnert, Dra. Maria Lúcia Racz, Dr. Klaus E. Stewien e Dr. Carlos Frederico Menck, e seus respectivos alunos, pelo empréstimo de equipamentos, reagentes e pelos ensinamentos transmitidos em cursos ou em conversas informais nos corredores da Virologia.

À toda minha família que além da dedicatória têm minha eterna gratidão.

À minha namorada Lílian Walsh Keller pelo apoio e incentivo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Vírus Respiratórios	13
1.1.1 Vírus Respiratório Sincicial Humano	13
1.1.2 Vírus da Parainfluenza	17
1.1.3 Vírus da Influenza	20
1.1.4. Adenovírus	24
1.1.5. Picornavírus	28
1.1.6 Metapneumovírus	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1. Coleta de amostras clínicas e casuística	34
2.2. Processamento das amostras clínicas	34
2.3. Manutenção da Cultura de Células	34
2.4. Manutenção das cepas padrão	35
2.5. Isolamento em cultura de células	35
2.6. Anticorpos monoclonais (MAbs)	36
2.7. Imunofluorescência indireta	36
2.8. Primers utilizados	37
2.9. Extração do RNA/DNA	39
2.10. Síntese do cDNA (RT)	40
2.11. Amplificação do cDNA (PCR de rotina para diagnóstico do HRSV)	40
2.12. Detecção do Produto Amplificado para a rotina do HRSV	41
2.13. Amplificação do cDNA para a Detecção pelo GenesCan (múltiplo-PCR)	41
2.14. Purificação dos Produtos Amplificados	42
2.15. Detecção dos Produtos Amplificados (GeneScan)	42
2.16. Tabulação e análise dos resultados	43
3. RESULTADOS	45
3.1. Casuística	45
3.2. Isolamento em cultura de células.	45
3.3 Diagnóstico pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI)	46
3.4. Diagnóstico por GeneScan (GS)	47
3.5. Teste de sensibilidade do Genescan	49
3.6 Resultados obtidos pela GS RT-PCR	51
3.7 Resultados obtidos pela IFI	51
3.8. Diagnóstico por GS x IFI das amostras clínicas de 2003	52
3.9. Teste de sensibilidade, especificidade e concordância do múltiplo RT-PCR	53
3.10. Comparação entre GS, IFI e semi-nested PCR para a detecção do HRSV.	53
3.11. Diagnóstico de Coinfecções	54
3.12. Sazonalidade dos vírus respiratórios	55

4. DISCUSSÃO	57
5. CONCLUSÕES	64
6. BIBLIOGRAFIA	65
ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO	74
ANEXO 2: DIAGNÓSTICO OBTIDO POR IFI E POR GENESCAN EM AMOSTRAS COLHIDAS EM 2003.	76
ANEXO 3: EXTRAÇÃO DE DNA ADENOVIRAL POR SHINAGAWA *	84

RESUMO

Thomazelli, LM. Vigilância epidemiológica de vírus respiratórios humanos em amostras clínicas pela técnica de GeneScan-RT-PCR [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2004.

As doenças respiratórias agudas (DRAs) são as causas mais comuns de morbidez e mortalidade infantil mundial, podendo ser causadas por uma grande variedade de microorganismos. A fim de se detectar os vírus respiratórios mais comumente associados às infecções agudas do trato respiratório e traçar seu perfil epidemiológico, utilizamos um protocolo de GS RT-PCR (GeneScan Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase) para a rápida detecção simultânea do, vírus influenza A e B, parainfluenzavirus tipo 1, 2 e 3, picornavirus, metapneumovírus e o adenovírus. As amostras clínicas foram colhidas de crianças menores de cinco anos de idade, apresentando sintomas respiratórios, no Hospital Universitário (HU) da Universidade de São Paulo (USP), durante o ano de 2003. O GS RT-PCR se mostrou uma metodologia sensível e específica, capaz de detectar uma diversidade maior de agentes infecciosos do trato respiratório em relação à Imunofluorescência Indireta (IFI), reduzindo neste estudo a porcentagem de amostras negativas de 69,9% (235 amostras) para 22% (74 amostras).

Palavras-chave: GeneScan; Vírus Respiratórios; Vírus Sincicial Respiratório; Influenza; Parainfluenza; Metapneumovírus.

ABSTRACT

Thomazelli, LM. GeneScan Reverse Transcription-PCR assay for surveillance of respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in Brazil [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2004.

A reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay based on automated fluorescent capillary electrophoresis and GeneScan software analysis was used to detect nine common respiratory viruses in clinical specimens from young children. Assays for human respiratory syncytial virus (HRSV), human parainfluenza viruses 1, 2, and 3, influenza A and B viruses, human metapneumovirus, adenovirus and picornavirus were incorporated into a screening PCR standard assay format. The optimized assay panel was used to test 336 respiratory specimens obtained from children hospitalized with acute respiratory illness (ARI) that had been previously tested by viral culture and indirect immunofluorescence staining (IIF). GS RT-PCR showed be a sensitive and specific methodology, able to detect a larger diversity of respiratory viruses regarding IFI, reducing in this study the percentage of negative samples of 69,9% (235 samples) to 22% (74 samples).

1. INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias agudas (DRAs) são as causas mais comuns de morbidez e mortalidade infantil no mundo, responsáveis por aproximadamente 30% dos óbitos na infância nos países em desenvolvimento (HINMAN, 1998). Cerca de 13 milhões de crianças morrem anualmente em todo o mundo, sendo que a maioria situa-se na faixa etária de até cinco anos, e dois terços destes óbitos ocorrem em menores de um ano (SCHUTZE and JACOBS, 1994). No Brasil, estudos demonstram que as DRAs perfazem 25-50% das consultas dos postos de saúde e cerca de 2/3 dos atendimentos de emergência em hospitais (SUTMOLLER, 1995). Apesar de raramente resultarem em mortes nos países desenvolvidos, essas viroses causam enormes custos direto e indireto com cuidados médico (DIXON, 1985; GARENNE, 1992; UNCF, 1992; MOGYOROS, 2001).

Uma grande variedade de microorganismos, que se propagam por meio de multiplicação na via respiratória, podem ser causadores de DRAs em crianças, sendo as viroses responsáveis por 50 a 90% delas (HALL and MCCARTHY, 1995; BEDOYA, 1996). Dentre esses agentes, o vírus respiratório sincicial humano (HRSV) é considerado como o de maior importância, é membro do gênero *Pneumovirus*, com dois sorotipos e mais de onze genótipos (van HOOGEN, 2001). Contudo outros patógenos estão associados a essas doenças respiratórias no mundo, tais como, Influenza com três subtipos, Parainfluenza (HPIV) com cinco subtipos, Adenovírus com mais de cinquenta sorotipos sendo apenas sete responsáveis por DRAs, Rinovírus com mais de cem sorotipos, além do Coxsackie com dois sorotipos e mais recentemente o Metapneumovírus (HMPV) com pelo menos dois sorotipos (OSIOWY, 1998; ARRUDA and HAYDEN, 1998; WILLIAMS, 2004).

Os mesmos vírus podem causar sintomas clínicos diferentes e os mesmos sintomas podem ser causados por diferentes vírus. As síndromes clínicas que acometem o trato respiratório podem ser divididas em dois grupos: as que acometem o trato respiratório superior (IVAS: infecção das vias superiores), ou seja, resfriado comum, faringite exsudativa, otite média e crupe; e aquelas que acometem o trato respiratório inferior (IVAI: infecção das vias aéreas inferiores), ou seja, traqueíte, bronquite, bronquiolite e pneumonia; sendo

as primeiras as mais freqüentes. Trata-se de classificação didática, estabelecida segundo critério anatômico, ou seja, acima e abaixo da epiglote, embora os vírus possam acometer mais de uma região simultaneamente (HEMMING, 1994). O espectro das síndromes clínicas causadas pelos vírus respiratórios mais freqüentes pode ser observado na **tabela 1**.

Tabela 1: Espectro das síndromes clínicas causadas pelos mais freqüentes vírus respiratórios.

Vírus	Coriza	Faringite	Crupe	Bronquite (bronquiolite)	Pneumonia ou doença sistêmica
Influenza A, B	++		+++	++	++++
Influenza C	++			+	
Parainfluenza 1	+++	++	++++	+	
Parainfluenza 2	+		++++		
Parainfluenza 3	+++	++	+++		+++
Respiratório sincicial	+++	+	++	++++	+
Metapneumovírus*	++++			++	+
Coxsackievírus					
A2,3,4,6,8,10	+	++++	+		++
Coxsackievírus A21, 24	+++	+		+	+++
Coxsackievírus B2,3,4,5	+	+	+		++
Echovírus 7,8,11,15,19,20	++	++	+		
Rhinovírus	++++	+	++		
Adenovírus 1, 2, 5	+	++			+
Adenovírus 3, 4, 7,14, 21	++	++++		+	++

Legenda: + até 25% dos casos; ++ 26-50% dos casos; +++ 51-75% dos casos; ++++ mais de 75% dos casos (modificado de AZEVEDO, 1998; *KASHIWA,2004).

Não existe tratamento específico para as DRAs, apenas existem procedimentos de suporte e tratamentos paliativos com antivirais, como a ribavirina no caso do HRSV e amantadina e rimantadina no caso do influenza. Entretanto, tem-se demonstrado que a vitamina A possui um importante papel na recuperação da integridade do epitélio respiratório injuriado. A administração de vitamina A exógena possui um efeito benéfico em crianças com doença severa (CHYTIL, 1992; HUSSEY, 1990).

Por muitos anos, o diagnóstico de infecções respiratórias virais em crianças jovens tem-se baseado em isolamento viral, detecção antigênica e resposta sorológica. Apesar destes métodos serem adequados para o diagnóstico, possuem importantes limitações. O isolamento viral, por exemplo, exige intensa mão de obra laboratorial e normalmente necessita de vários dias para ser concluído, o que dificulta o manejo clínico do paciente. Os ensaios de detecção antigênica como a imunofluorescência dependem de um observador experiente e variam em sensibilidade e especificidade. O diagnóstico sorológico apresenta dificuldade e demora da coleta de amostras de sangue na fase convalescente, e não pode ser aplicado a bebês, presumidamente por seu sistema imunológico ser prematuro e/ou apresentar anticorpos maternos que podem mascarar o resultado (HERMANN, 1988).

Com o advento da biologia molecular, tal como, ensaio com a Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (RT-PCR), foi possível aumentar a sensibilidade, especificidade e rapidez do diagnóstico de infecções respiratórias virais, bem como desenvolver ensaios que detectem simultaneamente, múltiplos patógenos respiratórios. A utilização de pares de *primers* desenvolvidos para genes altamente conservados possibilita a identificação de diferentes gêneros destes patógenos (EUGENE-RUELLAN, 1998), tanto em reações separadas que compartilhem condições de amplificação semelhantes (van ELDEN, 2002; WEST, 1999), como pela combinação de múltiplos primers numa única reação de amplificação (AGUILAR, 2000; FAN, 1998; GRONDAHL, 1999; OSIOWY, 1998).

Outra técnica bastante moderna na detecção de viroses respiratórias é o ensaio de RT-PCR detectado por GeneScan (GS-RT-PCR). O GeneScan (GS) é uma técnica de análise de fragmentos de DNA baseada na detecção automática de fluorescência durante eletroforese em capilar, bastante utilizada em procedimentos que requerem muita precisão no tamanho e quantidade do produto de DNA, incluindo seleção e validação de SNP (*single nucleic polymorfism*), análises de microsatélites, detecções de polimorfismos e outros.

O GS em aplicações de PCR, baseia-se na utilização de um *primer* marcado com fluorescência e outro não marcado usado para amplificar um alvo específico que gerará produtos de tamanhos esperados. O produto amplificado é combinado com um peso molecular padrão (*sizestandard*) e

submetido a uma eletroforese em seqüenciador automático de DNA, no qual o produto fluorescente é medido e quantificado. Erdman *et al.* 2003, utilizaram essa técnica combinada com a RT-PCR para o desenvolvimento de um ensaio sensível e específico, capaz de detectar seis vírus respiratórios diferentes (HRSV, HPIV 1, 2 e 3, e influenza A e B) em amostras clínicas, obtendo 161 (34,2%) HRSV, 4 (0,8%) HPIV1, 4 (0,8%) HPIV2, 10 (2,1%) HPIV3, 12 (2,5%) Influenza A e 14 (3%) influenza B, em 470 amostras de crianças hospitalizadas com DRA.

A fim de se obter uma melhor perspectiva da etiologia e epidemiologia das infecções respiratórias em crianças com DRAs atendidas no Hospital Universitário da USP durante o ano de 2003, utilizamos o GS RT-PCR para a detecção de nove principais viroses respiratórias (HRSV, HPIV1, 2 e 3, Influenza A e B, HMPV, Adenovírus e Picornavírus). O uso do Genescan sobre um painel de RT-PCR melhorou significativamente o diagnóstico destas viroses, visto que diminuiu consideravelmente o tempo, custo e sobretudo a mão de obra, já que possibilitou a detecção de vários vírus respiratórios em uma única reação em placa.

A rapidez da informação leva a medidas efetivas em termos individuais ou coletivos. Essa rapidez no diagnóstico é essencial para a prevenção da infecção hospitalar, em cuja etiologia os vírus respiratórios ocupam lugar de destaque, bem como poderá ser importante na utilização de terapias antivirais mais precisas, resultando em custos reduzidos e menos efeitos colaterais.

1.1 Vírus Respiratórios

1.1.1 Vírus Respiratório Sincicial Humano

O vírus respiratório sincicial humano (HRSV), assim denominado por produzir sincícios em cultura de células, foi isolado pela primeira vez no final da década de cinquenta, de uma criança com pneumonia e de outra com crupe (difteria laríngea) em Baltimore (CHANOCK, 1957). Posteriormente este vírus foi considerado o principal causador de doenças agudas do trato respiratório inferior durante a infância, sendo o principal responsável por um elevado índice de hospitalização de crianças com até 5 anos de idade (GLEZEN, 1986; CINTRA, 2001).

O HRSV, Ordem *Mononegavirales*, Família *Paramyxoviridae*, Sub-família *Pneumovirinae*, gênero *Pneumovirus* (van REGENMORTEL, 2000), é um virion composto de um nucleocapsídeo de simetria helicoidal envelopado. O vírus é pleomórfico, possui morfologia esférica e seu diâmetro varia entre 150 e 300 nm. O envelope consiste de uma bicamada lipídica que tem origem na membrana citoplasmática da célula hospedeira, porém as espículas, as glicoproteínas F e G, são de origem viral (COLLINS, 1996). A **figura 1** mostra um modelo representativo do vírus.

Fig.1: Modelo representativo do vírus respiratório sincicial humano (retirado de “The Big Picture Book of Viruses” - http://www.tulane.edu/~dmsander/Big_Virology/BVHomePage.html)

O genoma viral é composto de RNA de fita simples não segmentado de polaridade negativa (-ssRNA) com 15.225 nucleotídeos. Cada partícula viral contém uma única cópia funcional do genoma (COLLINS, 1996).

O genoma do HRSV (**Fig.2**) codifica 11 mRNAs distintos correspondendo cada um deles a uma única proteína: duas proteínas não-estruturais designadas como **NS1** e **NS2**, e dentre as estruturais, três são proteínas de superfície transmembrana (**G**, **F** e **SH**), duas estão presentes na matriz do vírus e são conhecidas por **M** e **M2**, e três estão associadas ao RNA genômico para formar o nucleocapsídeo viral (**N**, **P** e **L**) (COLLINS, 1996).

Fig.2: Esquema do genoma do HRSV (retirado de PubMed-NCBI homepage - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

As proteínas F e G são glicosiladas e localizadas na superfície do envelope viral. São importantes imunógenos durante a infecção viral (TRISTAM and WELLIVER, 1995), sendo que a proteína F também está envolvida na penetração do vírus na célula por fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira, resultando na liberação do nucleocapsídeo diretamente no citoplasma. A proteína F é conservada, ao contrário do observado com a proteína G, que está envolvida na adsorção do vírus e possui a função de antireceptor viral, além de ser análoga à hemaglutinina de outros vírus da família *Paramyxoviridae* mas sem possuir ação hemaglutinante. Todas as etapas do ciclo replicativo do HRSV ocorrem no citoplasma sem envolvimento do núcleo celular, assim como outros membros da família *Paramyxoviridae* (ver **fig.5**) (TRISTAM and WELLIVER, 1995).

A proteína SH (*small hydrophobic protein*) é uma pequena proteína transmembrana cuja função não foi esclarecida totalmente, que pode estar envolvida com processos de adsorção, penetração ou desnudamento do vírus (COLLINS, 1996).

As proteínas M e M2 (matrix proteins) são proteínas de matriz. Em geral, nos vírus RNA não segmentados e de polaridade negativa, a proteína M possui duas funções: tornar o nucleocapsídeo transcricionalmente inativo antes do seu empacotamento e mediar a associação do nucleocapsídeo com o envelope nascente (COLLINS, 1996).

As proteínas NS1 e NS2 possuem função desconhecida. O fato de serem não-estruturais sugere que estejam relacionados com a regulação da transcrição e da replicação do ácido nucléico viral (COLLINS, 1996).

As proteínas N (nucleoprotein), P (phosphoprotein) e L (large protein) são as proteínas presentes no nucleocapsídeo e, junto ao RNA gênomico, formam o complexo ribonucleoproteico. A proteína L por ser a maior e por sua localização, acredita-se que seja a enzima RNA polimerase RNA dependente (TRISTAM and WELLIVER, 1995). A proteína P é altamente fosforilada e apresenta-se como um fator de transcrição e replicação (COLLINS, 1996). Já a proteína N é a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo estando estritamente associada ao RNA gênomico (McINTOSH and CHANOCK, 1990).

O HRSV tem distribuição mundial, podendo acometer todas as faixas etárias, entretanto as crianças de 6 semanas a 9 meses são as que

desenvolvem problemas mais sérios, tais como: pneumonia e bronquiolite (COLLINS, 1996). A mortalidade é maior em crianças que apresentam alguns antecedentes que predispõem a doenças mais graves como: doenças congênitas, transplantados, imunodeficientes e outros.

A epidemia de HRSV apresenta uma sazonalidade bem clara, ocorrendo anualmente no período de outono tardio, inverno ou início da primavera, mas não durante o verão. Cada epidemia dura cerca de cinco meses, com 40% dos casos ocorrendo durante os meses de pico, geralmente no centro do surto (COLLINS, 1996; TAKAHASHI, 1998 and 2000).

A utilização de anticorpos monoclonais mostrou a presença de variações antigênicas que resultaram na divisão das amostras em dois grandes grupos: A representado pelas amostras A2 e *Long* e B representado pela amostra 18.537 (ANDERSON, 1985; GIMENEZ, 1986; MUFSON, 1985).

Estudos posteriores utilizando anticorpos monoclonais anti-proteína G demonstraram haver variações antigênicas dentro de cada grupo, possibilitando a divisão em onze subgrupos característicos sendo sete dentro do grupo A e quatro dentro do B (HENDRY, 1989; ANDERSON, 1991; HALL, 1990).

A contaminação ocorre por via ocular e nasal por contato com secreções ou, mais freqüentemente, por meio de objetos contaminados. A infecção ocorre no epitélio respiratório, cuja regeneração começa em três a quatro dias, porém células ciliadas só aparecem após duas semanas. O período de incubação viral varia de dois a oito dias.(HEIN, 1997).

O HRSV é um vírus lábil, sensível a extremos de temperatura e pH, bem como, detergentes e solventes. Ciclos de congelamento e descongelamento destroem efetivamente o vírus, mas congelamento rápido em gelo seco embebido com álcool ou em nitrogênio líquido preserva a infectividade, sobretudo se sacarose ou glicerina são adicionadas ao meio de congelamento e com estoques feitos à temperaturas baixas (-70 C) (TRISTAM and WELLIVER, 1995).

Muitos estudos estão voltados para o desenvolvimento de uma vacina contra o HRSV, porem ainda não há uma vacina segura e eficaz, para o uso em crianças. Os estudos, atualmente, são voltados para o desenvolvimento de vacina com vírus vivo atenuado e com vetores virais (GREENOUGH, 2001).

Outro tratamento profilático em estudo contra o HRSV é o Palivizumab (Synagis), um anticorpo monoclonal humanizado que induz imuno-profilaxia contra sérias infecções respiratórias do trato respiratório inferior (FENTON, 2004).

Quanto ao tratamento da doença causada pelo HRSV, geralmente consiste de um procedimento de suporte, com remoção mecânica das secreções, posicionamento apropriado da criança, administração de oxigênio umidificado e uso de broncodilatadores (COLLINS, 1996).

O uso da Ribavirina, um antiviral análogo do nucleosídeo guanosina, é controverso. Quando administrada oralmente, a droga apresenta moderada toxicidade hepática e da medula óssea e quando aplicada sob a forma de aerossol, parece ter pouca ou nenhuma toxicidade sistêmica. Apesar de a Ribavirina diminuir a quantidade de partículas virais secretadas pelo paciente e aumentar seus níveis de oxigenação, não há evidências de que haja diminuição das taxas de mortalidade, duração da hospitalização ou necessidade de terapias de suporte (COLLINS, 1996). Além disso, o tratamento utilizando Ribavirina requer altas doses para ser eficaz e a administração aerossolizada é prolongada, durando de 12 a 18 horas diárias e mais de sete dias de aplicação. Por isso, a Ribavirina possui uma eficácia clínica limitada no tratamento de infecções por HRSV (Xu, 2004).

1.1.2 Vírus da Parainfluenza

O vírus da parainfluenza foi detectado pela primeira vez no Japão, em 1953, e denominado inicialmente de Sendai ou vírus hemaglutinante do Japão (HVJ). A recuperação deste vírus foi realizada em ratos inoculados com tecido pulmonar de crianças falecidas por pneumonia. Em 1956, CHANOCK *et al.* recupera o vírus de uma criança com crupe, sendo então conhecido como vírus associado a crupe (CA). No final dos anos 50, mais três vírus antigênicamente distintos são isolados de crianças com doença respiratória aguda (LINDQUIST, 1997).

O vírus parainfluenza humano (HPIV), família *Paramyxoviridae*, gênero *Paramyxovírus*, é composto por genoma de RNA de fita simples de polaridade negativa (-ssRNA) não segmentado e contendo entre 15 e 20 Kb (**fig.3**), com

tamanho médio variando de 100 a 250 nm. Distingue-se dos outros vírus da família por seu envelope glicoprotéico com atividade hemaglutinante e neuraminidase (**fig.4**). Pode ser separado em tipos 1 a 4, tendo o tipo 4 dois sub-tipos, A e B (HENRICKSON, 1995).

Fig.3: Esquema do mapa genético do HPIV (retirado de PubMed-NCBI homepage - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Fig.4: Modelo representativo do HPIV (Alterado de LAMB and KOLAKOFSKY, 1996)

Todos os tipos compartilham antígenos comuns e vêm sofrendo variações antigênicas ao longo dos anos que os tornam diferentes das cepas iniciais (HENRICKSON, 1995).

O ciclo replicativo do HPIV é bastante semelhante ao do HRSV. Ocorre totalmente no citoplasma e pode ser observado resumidamente na **figura 5**.

Fig.5: Representação esquemática do ciclo de vida do HPIV. A replicação do RNA primeiro envolve a transcrição do mRNA a partir do genoma viral por uma transcriptase viral; depois, usando as proteínas produzidas pela transcrição, há uma produção de fitas positivas, que por sua vez são utilizadas para a síntese do RNA genômico viral. (retirado de LAMB and KOLAKOFSKY, 1996).

O HPIV é um vírus cosmopolita, sendo que os tipos 1 e 2 acometem principalmente crianças por volta dos dois anos de idade e o tipo 3, crianças abaixo de seis meses de idade. O HPIV 1 ocorre em epidemias a cada dois anos no outono; o HPIV 2 é menos estudado, mas pode aparecer junto com o HPIV 1 ou em anos alternados no outono e início do inverno, sendo seu surto um pouco mais longo. O HPIV 3 é endêmico, mas pode ter surto na primavera (HALL, 1987b; HENRICKSON, 1995). Há poucos dados epidemiológicos sobre

o HPIV 4 que tem sido isolado em pequeno número de casos (LINDQUIST, 1997).

A contaminação ocorre via trato respiratório superior com subsequente infecção do epitélio nasal e da nasofaringe. O vírus pode se espalhar de célula a célula ou por viremia. O processo inflamatório se estende por todo o trato respiratório, particularmente nos tecidos subglóticos, podendo ocorrer acúmulo de muco resultando em pneumonia. O período de incubação é de 3 a 4 dias e a excreção viral ocorre de 4 a 7 dias em média, podendo ser mais prolongada para o HPIV3 (HALL, 1987b; HENRICKSON, 1995).

Não existe vacina de uso corrente contra os HPIVs. Uma vacina de vírus inativado desenvolvida para o HPIV 3, embora elevasse os níveis séricos de anticorpos, não protegeu contra a doença. Tentativas estão sendo feitas com HPIV vivo atenuado modificado geneticamente para obtenção de vacina, inclusive, muitas já estão sendo avaliadas clinicamente (DURBIN, 2003).

1.1.3 Vírus da Influenza

O vírus da influenza é o agente etiológico de doença respiratória há provavelmente 2000 anos. A epidemia descrita por Hipócrates e Livy, em 412 a.C, provavelmente foi causada pelo vírus da influenza. Hirsch tabulou 299 epidemias de influenza entre 1173 e 1875. A primeira pandemia ocorreu em 1580, envolvendo Europa, Ásia e África do Norte. A mais notável pandemia foi a de 1918, com 20 milhões de mortos no mundo. De 1580 até 1918 ocorreram pelo menos oito pandemias (ZAHRADNIK and CHERRY; 1987; BETTS; 1995).

O termo influenza pode ter vindo do latim *influo* (fluir para dentro), indicando sua transmissão aérea ou talvez do italiano, relacionado a uma “influência” como o tempo ou causas astrológicas e místicas (ZAHRADNIK and CHERRY, 1987).

O vírus da Influenza A foi isolado em 1933 por Smith, sendo posteriormente isolado o influenza B em 1939 por Francis e o Influenza C em 1950 por Taylor e colaboradores (BETTS, 1995).

Os vírus pertencem à família *Orthomyxoviridae*, gênero A, B e C. O genoma viral é composto de RNA de fita simples de polaridade negativa (-ssRNA) e segmentado em oito (influenza A e B) ou sete (influenza C) partes. Contém aproximadamente 13,6 Kb (genoma total) (**fig.6**) e diâmetro de 90 a 120 nm. O envelope é coberto com espículas, partículas filamentosas esféricas ou alongadas (**fig.7**). Possui a capacidade de hemaglutinação e talvez com exceção do tipo C, a enzima neuraminidase (SPENCER and CHERRY; 1987).

Fig.6: Esquema do mapa genético do Influenza virus (retirado de PubMed-NCBI homepage - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Fig.7: Modelo representativo do Influenza virus (Alterado de LAMB and KRUG, 1996)

O ciclo de replicação do vírus influenza está resumido na **figura 8**, mostrando que diferentemente dos paramixovírus, seu ciclo replicativo se dá no núcleo e citoplasma da célula hospedeira. A replicação do RNA envolve inicialmente a transcrição do mRNA de cada segmento do RNA genômico viral por uma transcriptase viral; depois, usando as proteínas produzidas na transcrição, ocorre a produção de RNAs complementares de cada segmento.

Fig.8: Diagrama esquemático do ciclo de vida do vírus influenza (retirado de LAMB and KRUG, 1996)

O sistema de nomenclatura da OMS para os vírus da influenza especifica tipo, hospedeiro (para espécies animais), fonte geográfica, número da cepa e ano de isolamento; a designação do subtipo de hemaglutinina e neuraminidase vem entre parênteses. Exemplos: A/URSS/1/77 (H1N1) ou A/Filipinas/2/82 (H3N2) (BETTS; 1995).

A característica básica do vírus da influenza é a sua variação antigênica, evento freqüente, quase anual em se tratando do Influenza A. Esta variação parece ser menos freqüente com o tipo B, não tendo sido ainda descrito em relação ao tipo C (TAKAHASHI, 2001).

A variação antigênica envolve basicamente as duas glicoproteínas externas, hemaglutinina e neuraminidase. Até hoje foram reconhecidas 15 hemaglutininas e 9 neuraminidasas. A variação antigênica pode ser denominada de “shift” ou “drift”, dependendo da variação ser grande ou pequena. A variação tipo *drift* é pequena e ocorre freqüentemente dentro de um subtipo. Resulta de mutação que afeta o segmento do RNA que codifica a hemaglutinina ou a neuraminidase (é a mais comum). A variação tipo *shift* é mais complexa e provavelmente resulta da introdução de um novo segmento de RNA, levando a uma nova glicoproteína por rearranjo genético. Sendo, portanto um novo vírus para o qual a população não tem nenhuma imunidade (ZAHRADNIK and CHERRY; 1987).

O vírus da influenza é encontrado no mundo todo e pode ocorrer em surtos localizados, nacionais e mundiais. Os surtos geralmente ocorrem no inverno, com duração de 5-6 semanas (ZAHRADNIK and CHERRY; 1987; BETTS; 1995).

O período de incubação é de 2 a 3 dias e a excreção viral pode durar até duas semanas depois do início do quadro clínico. O vírus penetra no epitélio respiratório, levando a necrose extensa das células ciliadas do nariz e traquéia, já no primeiro dia depois do início dos sintomas ocorre o edema local e infiltrado mono e polimorfonuclear. Entre o 3º e 5º dia, inicia a regeneração do epitélio e após 15 dias reaparecem os cílios e a produção de muco. Se ocorrer infecção bacteriana secundária, o infiltrado inflamatório é mais intenso com destruição da membrana basal e um retardo na regeneração das células ciliadas (ZAHRADNIK and CHERRY; 1987; BETTS, 1995).

A primeira vacina contra a influenza foi introduzida no final dos anos 30, sendo uma vacina inativada, tratada com formalina e a única liberada para uso nos Estados Unidos. Esta vacina passou por várias inovações ao longo dos anos e, atualmente, para crianças se prefere a vacina que utiliza apenas algumas partículas virais ao invés do vírus todo (ZAHRADNIK and CHERRY; 1987).

A vacina contra a influenza para ser eficaz deve conter antígenos idênticos ou similares aos do potencial agente infectante. Assim, em anos onde ocorre variação antigênica grande, a eficácia da vacina pode ser apenas

moderada. Nos anos onde essa variação não ocorre, a eficácia da vacina é boa, porém o potencial epidêmico do vírus é mínimo (BETTS, 1995).

A vacinação é indicada somente para indivíduos com maior risco de desenvolvimento de complicações pela doença ou pessoas que possam transmitir o vírus para os indivíduos de risco. Fazem parte do grupo de risco crianças acima de seis meses com doença pulmonar crônica, doença cardíaca com repercussão hemodinâmica, pacientes recebendo imunossupressão, em casos de anemia falciforme e outras hemoglobinopatias, doença renal crônica e metabólica, diabetes, infecção pelo vírus HIV sintomática, pacientes recebendo aspirina em longo prazo e idosos (ZAHRADNIK and CHERRY, 1987; SERWINT, 1991; BETTS, 1995).

Como drogas profiláticas podem ser utilizadas, também, a amantadina e rimantadina. O nível de eficácia fica entre 75 e 90%, o que é similar à vacina. Não há diferença nos resultados entre as duas drogas, embora o uso de rimantadina provoque menos efeitos colaterais. A quimioprofilaxia deve ser indicada para indivíduos de alto risco, utilizando-se a droga por um período de 5 a 7 semanas durante surto de influenza, ou por duas semanas se for associada a vacina (HEIN, 1997).

Zanamivir e Oseltamivir são as mais novas drogas antivirais licenciadas (inibidores de neuraminidase) que possuem efeito contra influenza A e B e possuem menos efeitos colaterais. Demonstrou uma eficácia de aproximadamente 74% na prevenção de doenças em adultos saudáveis causadas por cepas de influenza na Austrália (GUY, 2004).

1.1.4. Adenovírus

O Adenovírus humano foi descrito por Rowe e colaboradores em 1953, a partir de tecido adenoidiano removido cirurgicamente. Hilleman e Werner, em 1954, isolaram vírus similar em amostras de lavados de garganta, obtidas de recrutas com doença respiratória febril aguda. Inicialmente, o adenovírus foi conhecido como agente de degeneração da adenóide (AD), agente RI – 67 (paciente com doença respiratória nº 67), recuperado de um recruta militar com

pneumonia atípica primária durante uma epidemia de doença respiratória febril aguda; agente adenofaringoconjuntival (APC) e agente de doença respiratória aguda (ARD). O nome adenovírus foi proposto em 1956, sugerindo o envolvimento característico do tecido linfadenoidiano.

O adenovírus família Adenoviridae, gênero *Mastadenovirus* é um vírus com diâmetro de 60 a 90 nm e não possui envelope. O capsídeo possui 252 subunidades chamadas capsômeros dispostos numa estrutura icosaédrica (**fig.9**). Pode ser dividido em três grupos, baseado na quantidade de guanina-citosina do seu DNA e disso depende seu potencial oncogênico.

Fig.9: Modelo representativo do adenovírus humano (retirado de DOERFLER, 1995)

O genoma viral é composto de DNA de fita-dupla, linear, não segmentado, contendo de 30.000 a 38.000 nucleotídeos (dependendo do tipo), com capacidade, em teoria, de codificar 30-40 genes (**fig.10**). A estrutura genômica (hibridização cruzada, mapa de restrição) é uma das características usadas para classificá-los em grupos (70-95% de homologia dentro dos grupos, 5-20% de homologia entre os grupos).

Fig.10: Esquema do genoma do adenovírus (retirado de PubMed-NCBI homepage - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Os determinantes antigênicos estão nas sub-unidades estruturais protéicas (hexons, pentons e fibras). O antígeno hexon (componente alfa) é comum a todos os adenovírus dos mamíferos e é detectado por ELISA ou fixação de complemento. Outro antígeno hexon (componente epsilon) reage com anticorpos neutralizantes. O antígeno relacionado com as fibras também induz anticorpos neutralizantes tipo específicos para alguns tipos de adenovírus. (SPENCER and CHERRY, 1987). Atualmente, existem 51 sorotipos dentro de 6 sub-grupos (A a F) de adenovírus humanos caracterizados e mais algumas cepas intermediárias ou atípicas (ADRIAN and WIGAND, 1992; BENKO, 1999).

As replicações de todos os adenovírus são similares e ocorrem no núcleo da célula hospedeira. Inicialmente há a adsorção do vírus através da fibra a receptores específicos existentes na membrana celular. A penetração envolve fagocitose por vacúolos fagocíticos, nos quais a atividade tóxica dos pentons é responsável pela ruptura da membrana fagocítica e liberação da partícula no citoplasma. O DNA viral migra, num processo que envolve os microtúbulos celulares, para dentro do núcleo da célula hospedeira, por meio de poros, onde é transcrito e replicado (**fig.11**). A síntese das proteínas virais ocorre no citoplasma, mas a montagem dos novos capsídeos e a incorporação do ácido nucléico viral processa-se no núcleo. A liberação dos vírus ocorre lentamente, após a morte da célula (HORWITZ, 1985).

Fig.11: Despacotamento segue uma sequência, primeiro os pentons liberam a partícula semi-despacotada esférica dentro do citoplasma. O core migra para o núcleo onde o DNA do adenovírus entra por meio dos poros nucleares, ali ele é convertido num complexo célula-DNA viral. (retirado de DOERFLER, 1995)

O vírus é encontrado no mundo todo e pode circular de forma esporádica, endêmica ou epidêmica no inverno, primavera e começo do verão, sendo que a maioria dos adenovírus associados a infecções respiratórias pertencem aos sorotipos 1 ao 6 (SPENCER and CHERRY; 1987; EDWARDS; 1985). A infecção ocorre em todas as idades mas a incidência é maior nas faixas etárias mais baixas, principalmente entre seis meses e cinco anos. Os quadros respiratórios mais graves ocorrem em crianças de 3 a 18 meses de idade (SPENCER and CHERRY, 1987; EDWARDS; 1985).

Na maioria das vezes a infecção inicial ocorre no trato respiratório e envolve a mucosa nasal, orofaringe e conjuntiva. O Adenovírus tem sido isolado de secreções de dois dias antes do início da doença até oito dias após o início da sintomatologia. O período de incubação para doença respiratória por adenovírus é de 4-5 dias. Dados de necropsia de pacientes com pneumonia por adenovírus mostram perdas dos cílios do epitélio da traquéia,

proliferação de outras células epiteliais respiratórias e inclusões intranucleares. Nos casos mais graves ocorre bronquite necrosante com infiltrado mononuclear, edema de vasos e trombose (SPENCER and CHERRY; 1987).

Os Adenovírus causam uma gama variada de quadros clínicos que incluem infecções respiratórias (nasofaringites, faringite, amigdalite, laringotraqueite, bronquiolite e pneumonia) e não respiratórias (febre faringoconjuntival, ceratoconjuntivite epidêmica, cistite hemorrágica, diarreia, intussuscepção intestinal e infecção do sistema nervoso central) (SPENCER and CHERRY; 1987; BAUM; 1995). Estudos sorológicos têm demonstrado que cerca de 10% de todas as doenças respiratórias em crianças são causadas pelo adenovírus (BRANDT, 1969; OSIOWY, 1998).

Os adenovírus são altamente estáveis, resistente a solventes lipídicos e grandes variações de pH (de 2 a 10), mantém atividade em temperatura ambiente por duas semanas e por pelo menos 70 dias a 4 °C. Podem ser inativados por dodecil sulfato de sódio (SDS), que quebra a estrutura do capsídeo (SPENCER and CHERRY, 1987).

Não há tratamento específico para o adenovírus, existem vacinas parenterais de vírus vivo atenuado que são razoavelmente efetivas mas não são de uso corrente pelo potencial oncogênico do adenovírus. Foi desenvolvida uma vacina oral para uso em recrutas, contendo os tipos 4 e 7 e pode ser usada com segurança, pois a inoculação gastrointestinal não resulta em doença (BAUM; 1995).

1.1.5. Picornavírus

Picornavírus são pequenos vírus com genoma de RNA fita simples com polaridade positiva e tamanho de 7,2 a 8,4 Kb, não envelopados e diâmetro de 28-30 nm, membros da família *Picornaviridae*. O capsídeo icosaédrico (**fig.12**) é formado por 60 protômeros, cada um deles constituído por quatro proteínas virais (VP1-VP4). Agrupamentos de VP1, VP2 e VP3 formam a parte externa de cada protômero, enquanto VP4 está localizada mais internamente (ROSSMAN, 1985).

Picornavírus é uma classificação dada a uma gama muito variada de vírus que estão entre os menores conhecidos, como seu próprio nome

demonstra, e que compreendem uma das maiores e importantes famílias de patógenos humanos e agrícolas. A família é dividida em cinco gêneros: Rhinovirus, Enterovirus, Aphthovirus, Cardivirus e Hepatovirus.

Os enterovirus são denominados dessa forma pois a maioria infecta o trato gastro-intestinal (entérico), incluindo não só os poliovírus (3 sorotipos), mas também os coxsackievírus (23 sorotipos), os echovírus (31 sorotipos), mais de 70 enterovirus humanos, o vírus da hepatite A humana (1 sorotipo), e muitos outros vírus entericos não humanos.

Os Rinovírus (human rhinovirus – HRV) são os principais representantes dos picornavírus, dentre as enfermidades respiratórias (**fig.12**). O HRV é o mais freqüente agente etiológico de resfriados comuns, ocorrem em todo mundo, em pessoas de todas as idades, inclusive em grupos isolados, tais como tribos indígenas da Amazônia. São conhecidos mais de 100 sorotipos de HRVs e vários deles podem cocircular em uma determinada região, num mesmo período de tempo (ARRUDA, 2000).

Fig.12: Modelo representativo do vírus HRV, principal representante dos picornavírus respiratórios (retirado de “The Big Picture Book of Viruses”-http://www.tulane.edu/~dmsander/Big_Virology/BVHomePage.html)

O ciclo replicativo do HRV ocorre totalmente no citoplasma assim como todos os outros picornavírus, que pode ser observado resumidamente na **figura 13**. Começa com a ligação do vírus ao receptor específico levando a

modificações conformacionais no capsídeo, incluindo perda da proteína VP4 e liberação do RNA viral. Por meio de uma cadeia de reações, o RNA viral de polaridade positiva é copiado em um RNA de polaridade negativa, que servirá de molde para a produção de múltiplas cópias de RNA positivo. Esta síntese ocorre em associação com o retículo endoplasmático liso em múltiplos pontos da célula (RACANIELLO, 2001).

Fig.13: Esquema do ciclo replicativo dos picornavírus (retirado de RACANIELLO, 2001)

Os HRV infectam grandes primatas, mas induzem sintomas somente em seres humanos. Os sintomas de resfriado não são causados por destruição tecidual e sim pela ação de mediadores inflamatórios liberados devido à infecção por HRV. Estes mediadores causam vasodilatação, edema tecidual, transudação de proteínas plasmáticas, secreção glandular e provavelmente sensibilização dos reflexos neurais associados com sintomas comumente observados de congestão nasal, rinorréia, espirro e dor de garganta (GWALTNEY and HANINZ, 2002).

Durante uma infecção por HRV, o vírus pode ser detectado em secreções nasais 8 a 18 horas após inoculação experimental, os sintomas

surgem precocemente, em cerca de 10-12 horas. A excreção viral atinge seu pico em cerca de 48 horas e depois declina, mas pode durar até 3 semanas (GWALTNEY and HANINZ, 2002).

1.1.6 Metapneumovírus

O Metapneumovírus humano (HMPV) é um vírus respiratório, de RNA de fita simples e polaridade negativa, recentemente descoberto, pertencente à Família *Paramixoviridae*, Sub-família *Pneumovirinae* e Gênero *Metapneumovirus*. A classificação foi baseada em suas atividades biológicas, caracterização protéica, organização do genoma e critérios morfológicos por microscopia eletrônica (**fig.14**) (Hoogen, 2002).

Fig.14: Micrografia eletrônica do metapneumovírus. Ao centro a imagem mostra 5 partículas pleomórficas de HMPV. As imagens no canto superior direito e canto inferior esquerdo são, respectivamente, do nucleocapsídeo e partículas parecidas com retículos filamentosos. A lâmina foi preparada com ácido fosfotungstênico a 2%. (Retirado de “The Big Picture Book of Viruses”- http://www.tulane.edu/~dmsander/Big_Virology/BVHomePage.html)

Este vírus foi primeiramente descrito na Holanda, a partir de isolados de amostras de aspirado de nasofaringe de 28 crianças, entre 0 e 5 anos de idade, apresentando sintomas clínicos iguais aos causados por HRSV. Os efeitos citopáticos, induzidos por estes vírus isolados, foram indistinguíveis dos causados pelo HRSV, na qual há formação característica de sincício, seguida de rápida ruptura da membrana interna das células e subsequente desprendimento da placa de cultura. Sendo que o aparecimento de efeito citopático ocorre mais tardiamente que os observados pelo HRSV, 10 a 14 dias após a inoculação (van HOOGEN, 2001).

Um outro estudo feito em crianças australianas que apresentavam sintomatologia homóloga, mas que eram negativas, para HRSV, influenza A e B, parainfluenza 1, 2, 3 e adenovírus, detectou o HMPV, sugerindo que o vírus tem sido identificado em vários países da Europa, América do norte e Austrália. Acredita-se que o HMPV já tenha se espalhando por todo o mundo e esteja circulando no homem por no mínimo 50 anos (NISSEN et al., 2002).

O genoma do HMPV tem cerca de 13.378 nucleotídeos que codificam para 8 proteínas, sendo três proteínas, estruturais, de superfície transmembrana (G, F e SH), duas estão presente na matriz do vírus (M e M2) e as três outras estão associadas ao RNA genômico para formar o nucleocapsídeo viral (N, P e L). Apesar da sintomatologia ser homóloga à do HRSV, a organização genômica do HMPV (**fig.15**), assemelha-se ao do Pneumovírus aviário (APV) do tipo C, agente etiológico de doenças no trato respiratório superior em aves, pois não possui em seu genoma as proteínas não estruturais NS1 e NS2 (van HOOGEN, 2002; NISSEN et al., 2002).

Fig.15: Esquema do genoma do HMPV (retirado de PubMed-NCBI homepage - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Van Den Hoogen *et al.* 2001, na expectativa de demonstrar se o HMPV é um patógeno primário humano ou um patógeno aviário que infecta humano, inoculou HMPV nos órgãos respiratórios e em outros tecidos conjuntivos de perus, frangos e macacos obtendo replicação viral e presença de quadro clínico associado à rinite supurativa apenas em macacos. Estes dados preliminares sugerem que o HMPV é um patógeno associado a doenças respiratórias em primatas (van HOOGEN, 2002).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de amostras clínicas e casuística

As amostras foram colhidas de 336 crianças, com até cinco anos de idade, que apresentavam doença respiratória aguda (DRA) atendidas no Hospital Universitário da USP, no setor de Enfermaria ou Unidade de Terapia Intensiva (UTI), durante o ano de 2003. Aspirados de nasofaringe foram colhidos, por enfermeiras, em no máximo 48 horas após a admissão, com consentimento pós-informado dos pais ou responsáveis e com aprovação da Comissão de Ética Médica do Hospital Universitário (**anexo 1**).

Para a colheita das amostras foram utilizados dois frascos contendo 3.5 mL de solução salina tamponada fosfatada (PBS) a 0,01M, pH 7,2 e esterilizada. De uma das narinas da criança foi colhido espécime clínico com um *swab* umedecido em PBS e transferido imediatamente para o mesmo frasco contendo a solução. Na outra narina, fluidificada com 1 mL de PBS, do outro frasco, foi introduzido uma sonda esterilizada (sonda uretral nº 6) que, à vácuo, aspirou com movimentos giratórios a secreção de nasofaringe depositando-a em um equipo de solução parenteral, também esterilizado.

2.2. Processamento das amostras clínicas

O material colhido foi transportado em isopor com gelo ao laboratório, sendo processado no mesmo dia. Os aspirados foram misturados, homogeneizados, tratados com 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Gibco BRL), e separados em 2 alíquotas: uma para inoculação em cultura de células (600µL) e Imunofluorescência Indireta (IFI), outra para a RT-PCR (500µL) adicionando-se TRIzolTM LS (Invitrogen) volume a volume.

2.3. Manutenção da Cultura de Células

Foram utilizadas duas linhagens de células: HEp-2, gentilmente cedidas pelo Dr. Larry J. Anderson, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Center for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA-USA, e HeLa-I, gentilmente

cedida pelo Dr. Eurico Arruda (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP). As células cresceram em Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM) acrescido de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, além de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB – Cultilab). O crescimento foi feito em garrafas plásticas de 25 cm² (Corning-USA) sendo repicadas semanalmente com auxílio de solução de ATV (0,2% de Tripsina 1/250 Sigma e 0,02% de EDTA).

2.4. Manutenção das cepas padrão

Como cepas padrão de HRSV utilizamos as amostras A2 e 18537, gentilmente cedidas pela Dra. Marilda Siqueira (Departamento de Virologia da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil) e para os demais vírus, amostras diagnosticadas positivas por IFI. Para o cultivo das cepas, utilizamos as células HEP-2 e HeLa-I. As células foram crescidas em garrafas de 25 cm² até 70-80% de confluência. O meio de crescimento foi então retirado e foram inoculados 500µL de amostra A2 ou 18537, já anteriormente cultivadas em cultura de células. Após incubação em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 30 minutos, foram acrescidos 6 mL de meio de manutenção (MEM + 2% de SFB + 100 U/mL de penicilina + 100 µg/mL de estreptomicina), incubando-se nas mesmas condições acima descritas até o aparecimento de cerca de duas cruzes (aproximadamente 50% das células infectadas) de efeito citopático (ECP). A seguir as células foram raspadas com o auxílio de um *scraper*, homogeneizadas ao meio de manutenção e aliquoteadas para estoque em freezer -70°C.

2.5. Isolamento em cultura de células

As células foram crescidas em placas de 24 orifícios (Corning-USA) até 70-80% de confluência. O meio de crescimento foi retirado e foram inoculados 100µL das amostras clínicas por orifício, num total de 3 orifícios por linhagem celular. A incubação das células foi realizada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Nos casos positivos, onde se observou ECP, o material foi cultivado em

garrafas de 25cm² e armazenados em freezer -70°C até o momento de serem processados.

2.6. Anticorpos monoclonais (MAbs)

A presença de antígenos HRSV, vírus influenza A e B, vírus parainfluenza 1, 2 e 3 e adenovírus em secreções de nasofaringe ou culturas de células foi pesquisada pela técnica de IFI utilizando sete diferentes *blends* de MAbs (kit Chemicon International, Inc.). Para o HRSV utilizamos o MAb 858-4 (*blend* dos MAbs 858-1, 858-2 e 858-3, respectivamente específicos para as proteínas F, G e N). Para os vírus influenza A e B utilizamos respectivamente os MAbs 8251 (*blend* específico para nucleoproteína) e 8661 (*blend* específico para nucleoproteína e hemaglutinina). Para o vírus parainfluenza 1 utilizamos o MAb 834-3 específico para proteína de fusão (*blend* dos MAbs 834-1 e 834-2), para parainfluenza 2 utilizamos o MAb 844-3 específico para proteína HN (*blend* dos MAbs 844-1 e 844-2) e para o vírus parainfluenza 3 utilizamos o MAb 855-3 também específico para proteína HN (*blend* dos MAbs 855-1 e 855-2). Finalmente para o adenovírus utilizamos o MAb 805 (*blend* dos MAbs 8051 e 8052) que reage com 41 sorotipos diferentes de adenovírus. A tipagem das amostras positivas para HRSV foi realizada utilizando-se os MAbs 92-11c e 102-10b específicos para proteína F (gentilmente cedidos pelo Dr. Larry J. Anderson, CDC, Atlanta-USA). Todos os MAbs foram diluídos a 1:100 em PBS acrescido de 0.1% de azida sódica.

2.7. Imunofluorescência indireta

Após estabilizar as lâminas à temperatura ambiente, seguiu-se com a reação utilizando como primeiro anticorpo um dos MAbs citados, em orifícios distintos. Incubamos a 37°C em câmara úmida por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS 0,01M pH 7.2 acrescido de 0.05 % de *tween* seguindo-se uma lavagem com água destilada. Após secagem, utilizamos como segundo anticorpo um conjugado anti-IgG de camundongo feito em cabra marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-Sigma) diluído a 1:100 em

solução de Azul de Evans 0.02% em PBS. As lâminas foram incubadas e lavadas como descrito acima, acrescentando-se duas lavagens em água destilada. Após secagem, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (90% de glicerina e 10% de tampão carbonato-bicarbonato 0.5M pH 9.5) e lidas em microscópio de fluorescência LEICA com epi-iluminação.

2.8. Primers utilizados

As seqüências alvos foram regiões da subunidade F1 do gene de glicoproteína de fusão do HRSV e do HMPV, do gene de hemaglutinina-neuraminidase (HN) para HPIV-1,2 e 3, genes de proteína não estrutural (NS1) do vírus influenza A e B, do gene hexon para adenovirus e finalmente a seqüência 5' NCR para o Picornavirus. As características de cada *primer* no genoma viral e seus respectivos tamanhos esperados dos produtos amplificados estão representados na **tabela 2**, ressaltando que os *primers* *sense* possuíam um marcador fluorescente (FAM-Gibco BRL) para posterior tipagem no GeneScan.

As seqüências foram selecionadas de procedimentos descritos previamente (MAZZULLI, 1999; ECHEVARRIA, 1998; CLASS, 1992; HALONEN, 1995; XU, 2001; FALSEY, 2003).

Tabela 2 - Lista dos *primers* usados nas reações de GS RT-PCR.

Virus	Primer ID	Gene	Location	Polarity	Sequences (5'>3')	Amplicon size (bp)
HRSV ^a	RSVAB-F1-FAM	F	1111-1134	+	AACAGTTTAACATTACCAAGTGA	380
	RSVAB-R1		1468-1490	-	TCATTGACTTGAGATATTGATGC	
HPIV1 ^b	HPIV1-F1-FAM	HN	780-801	+	CCGGTAATTTCTCATACCTATG	317
	HPIV1-R1		1076-1096	-	CCTTGGAGCGGAGTTGTTAAG	
HPIV2 ^b	HPIV2-F1-FAM	HN	845-866	+	CCATTTACCTAAGTGATGGAAT	203
	HPIV2-R1		1027-1048	-	GCCCTGTTGTATTTGGAAGAGA	
HPIV3 ^b	HPIV3-F1-FAM	HN	884-905	+	ACTCCCAAAGTTGATGAAAGAT	102
	HPIV3-R1		966-986	-	TAAATCTTGTTGTTGAGATTGA	
Influenza A ^c	FLUA-F1-FAM	NS1	467-486	+	CTAAGGGCTTTACCCGAAGA	192
	FLUA-R1		637-656	-	CCCATTCTCATTACTGCTTC	
Influenza B ^c	FLUB-F1-FAM	NS1	746-755	+	ATGGCCATCGGATCCTCAAC	241
	FLUB-R1		967-986	-	TGTCAGCTATTATGGAGCTG	
Adenovirus ^d	ADENO-F1-FAM	Hexon		+	CCC(AC)TT(CT)AACCACCACCG	167
	ADENO-R1			-	ACATCCTT(GCT)C(GT)GAAGTTCCA	
HMPV ^e	MPVF-F1-FAM	F		+	GAGCAAATTGAAAATCCCAGACA	347
	MPVF-R1			-	GAAACTGCCGCACAACATTTAG	
Pic ^f	PICO-F3-FAM	5'NCR		+	GGCCCCTGAATG(CT)GGCTAA	114-115
	PICO-R3			-	GAAACACGGACACCCAAAGTA	

^aMazzulli T, et al. (1999).^bEchevarría JE, et al. (1998).^cClaas ECJ, et al. (1992).^dXu W, et al (2001)^eFalsey AR, et al. (2003)^fHalonem, et al. (1995)

Para a PCR de rotina do laboratório foram utilizados os *primers* descritos a seguir para o diagnóstico do HRSV:

FV (+): GTT ATG ACA CTG GTA TAC CAA CC

GAB (-): YCA YTT TGA AGT GTT CAA CTT

F1AB (semi-nested): CAACTCCATTGTTATTTGCC

Estes primers amplificam tanto fragmentos de HRSV do tipo A quanto do B, sendo que para o primeiro o tamanho esperado é de 653 pares de bases e 656 pares de bases para o segundo.

2.9. Extração do RNA/DNA

Para as amostras inoculadas (controle positivo), o meio de manutenção foi desprezado e o tapete celular lavado duas vezes com PBS 0,01 M e pH 7.2 esterilizado e gelado para retirar o restante do meio de cultura. Foi adicionado 2mL de TRIzol™ / 100mg de tecido (10×10^6 células), ou seja, aproximadamente 1mL do produto por garrafa de 25cm² inoculada. O homogeneizado de células lisadas foi armazenado em freezer -70°C ou se procedeu a extração do RNA. Para as amostras clínicas foi usado a alíquota estocada com TRIzol.

Como controle negativo, o procedimento de preparação foi o mesmo, porem utilizando água UltraPure (Gibco-BRL) em cada série de 10 amostras para monitorar o potencial de contaminação cruzada.

Ao lisado de células (1mL) ou à alíquota de amostra clinica foi adicionado 10% de clorofórmio (Merck), homogeneizando em vortex e incubando em banho de gelo por 5 minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. A seguir, para a extração do RNA, o sobrenadante foi transferido para um tubo tipo eppendorf, e para a extração do DNA adenoviral, a interfase entre o sobrenadante (fase aquosa) e o fenol, foi transferida cuidadosamente para outro tubo. Para o RNA adicionou-se isopropanol (Sigma) volume a volume, homogeneizou, incubou por 15 minutos em gelo e seguiu-se de uma centrifugação a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e ao restante acrescentou-se 800µL de etanol 75% (Merck) seguindo-se de uma centrifugação a 9000 rpm durante 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o *pellet*, após secagem, ressuspendido em 50µL de água UltraPure. Para o DNA, após o descarte do sobrenadante, acrescentou-se 300µL de etanol absoluto. Após Incubação a temperatura ambiente por 3 min e centrifugação por 2.000xg por 5min /4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1mL de solução (0,1 M sodium citrate em etanol 10%). Incubou-se a temperatura ambiente por 30 min seguido de centrifugação à 2.000xg por 5 min/4°C, repetiu-se a lavagem anterior e ao pellet foi acrescentado 1,5 ml de etanol 75%. Após 30 min no speedvacuum o pellet foi finalmente ressuspendido em

50µL de água Ultrapure + 1U de inibidor de ribonuclease. O RNA resultante foi armazenado à -70°C e o DNA à -20°C.

2.10. Síntese do cDNA (RT)

A transcrição do cDNA ocorreu baseada no kit comercial High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, cat.n 4322171), na qual, 50 µL de RNA extraído foram diluídos em tampão contendo 50 pMoles de *Random primers* 10x e demais reagentes obtendo-se um tampão de reação 50 mM de Tris-HCl [pH 8.3 a 25°C] / 75 mM de KCl / 3 mM de MgCl₂ (10x RT Buffer), 10 mM de Dithiothreitol, 50 U/µL de MultiScribe RT enzyme, 02 U de Inibidor de Ribonuclease, 1.5 mM de 25x dNTP mixture e água UltraPure (Gibco) q.s.p. 100µL. A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). O cDNA foi armazenado em freezer -70°C.

2.11. Amplificação do cDNA (PCR de rotina para diagnóstico do HRSV)

A amplificação foi efetuada a partir de 5µL de cDNA diluído em tampão 20 mM de Tris-HCl [pH 8.4] / 50 mM de KCl / 1.5 mM de MgCl₂ (PCR buffer – Amersham Pharmacia Biotech), 50 pMoles de cada *primer* (FV e GAB), 2.5 U de Taq DNA Polimerase (Amersham Pharmacia Biotech), 0.2 mM de cada dNTP e água MilliQ tratada com DEPC q.s.p. 100µL. As amostras foram amplificadas no termociclador GeneAmp PCR System 2400. A amplificação foi efetuada a partir de uma etapa 94°C por 5' seguida de 40 ciclos de 94°C por 1' / 54°C por 1' / 72°C por 1' e uma etapa final de 72°C por 5'. Para as mostras negativas, foi realizado um semi-nested PCR, seguindo o item 11 substituindo-se o *primer* FV pelo F1AB.

2.12. Detecção do Produto Amplificado para a rotina do HRSV

A detecção do produto amplificado pela PCR de rotina do HRSV foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Gibco) 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL. 10 µL da amostra foi misturada a 2 µL de azul de bromofenol e submetidos à eletroforese em cuba horizontal durante 40 min a 100 V. A visualização do gel foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta, sendo fotografado digitalmente para análise detalhada.

2.13. Amplificação do cDNA para a Detecção pelo GenesCan (múltiplo-PCR)

A amplificação foi efetuada a partir de uma triagem (*screening*) em placa de 96 orifícios (**fig.16**), na qual 3µL de cDNA foi diluído em tampão 20 mM de Tris-HCl [pH 8.4] / 50 mM de KCl / 1.5 mM de MgCl₂ (Biotools), 25 pMoles de cada *primer* (um conjunto de *primers* para cada vírus estudado por fileira da placa), 1 U de Taq DNA Polimerase (Biotools), 0.2 mM de cada dNTP e água UltraPure q.s.p. 25µL. As placas foram amplificadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A amplificação foi efetuada a partir de uma etapa 94°C por 2' seguida de 35 ciclos de 94°C por 45''/ 54°C por 45'' / 72°C por 45'' e uma etapa final de 72°C por 5'. Os produtos amplificados foram estocados a 4°C.

Os adenovirus foram amplificados separadamente dos outros vírus RNA, sendo realizado em uma placa separada seguindo a descrição do **item 2.11.**, com modificações nos *primers*.

Fig.16: Esquema de Screening de placa de 96 orifícios, na qual cada coluna corresponde a uma amostra diferente (12 amostras por placa) e cada fileira corresponde a um vírus diferente. HRSV- Vírus respiratório sincial humano; HMPV- Metapneumovirus humano; PIII- Parainfluenza 3; PII- Parainfluenza 2; PI- Parainfluenza 1; IA- Influenza A; IB- Influenza B e Pic- Picornavírus.

2.14. Purificação dos Produtos Amplificados

Foi feito um *pool* com os produtos de PCR, misturando 15 μ L de todos os orifícios de cada coluna da placa mais 15 μ L do produto correspondente ao adenovírus. Ao pool acrescentou-se 150 μ L de isopropanol absoluto, após incubação de 15 min, o produto foi centrifugado a 12.000 rpm/ 20min / 10°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo lavado com 250 μ L de isopropanol 75%, seguido de centrifugação a 12.000 rpm/ 5min / 10°C. O sobrenadante foi desprezado novamente e o tubo secado em *speed vacuum* por 15min a 60°C. O *pellet* foi diluído em 20 μ L de água *Ultrapure* e conservado em geladeira.

2.15. Detecção dos Produtos Amplificados (GeneScan)

Os produtos purificados foram analisados e quantificados utilizando o Analisador Automático de DNA ABI Prisma molelo 310, com detecção para marcadores fluorescentes, utilizando o programa Genescan para quantificação e análise de fragmento de DNA. A genotipagem foi possível devido aos *primers*

específicos para cada agente etiológico marcados com fluorescência (FAM) e diferenciados por tamanho do fragmento de DNA gerado. 1 µL do produto de PCR purificado foi misturado com 12 µL de formamida deionizada e 0,5 µL de sizestandard (Genescan 500 TM Rox). A inclusão do padrão de peso molecular em cada amostra permite a compensação de eventuais variações que possam ocorrer entre as corridas eletroforéticas. Essa mistura foi colocada no Termociclador para denaturação: 95°C por 3 minutos e imediatamente colocada em gelo até a análise no aparelho.

Os produtos foram submetidos a corrida eletroforética de DNA no ABI MOLDELO 310 (APPLIED Biosystems), os tubos foram dispostos em uma bandeja, devidamente identificados e em seguida foi dado início a eletroforese, comandados por um computador acoplado ao equipamento. A partir desse momento iniciou-se a injeção da primeira amostra ao interior de um capilar medindo 47 cm de comprimento, preenchido por um polímero POP-4 (Applied Biosystems ABI ®). A injeção da amostra no capilar durou 5 segundos sob uma corrente elétrica de 15.000 volts. Após a injeção, iniciou-se a corrida eletroforética que durou cerca de 30 minutos à temperatura de 60°C.

Os fragmentos marcados foram detectados por um feixe a laser e por uma câmara CCD utilizando-se um filtro virtual "A", que em seguida foram analisados pelo programa ABI 310 Genescan (Applied Biosystems ®), produzindo eletroferogramas com dados quanto ao tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) e quanto à intensidade de fluorescência em Unidades relativas de Fluorescência (URF).

2.16. Tabulação e análise dos resultados

Técnicas como IFI de material clínico e/ou cultura celular (IFI+CC), semi-nested PCR e GS RT-PCR foram comparadas entre si quanto ao diagnóstico dos vírus respiratórios. Foram calculadas a sensibilidade, especificidade e proporção de concordância observada, de acordo com o método descrito em Armitage and Berry (1994), com os dados tabulados de acordo com a **tabela 3**.

Tabela 3: Esquema de tabulação dos resultados para posterior comparação.

		Referência		
		Positivo	Negativo	Total
Teste	Positivo	A Nº de amostras positivas verdadeiras detectadas pelo teste	B Nº de amostras negativas verdadeiras detectadas pelo teste (falso positivas)	A+B Total de amostras detectadas pelo teste
	Negativo	C Nº de amostras positivas verdadeiras não detectadas pelo teste (falso negativas)	D Nº de amostras negativas verdadeiras não detectadas pelo teste	C+D Total de amostras negativas pelo teste
	Total	A+C Total de amostras positivas verdadeiras	B+D Total de amostras negativas verdadeiras	N Total de amostras analisadas

Com os dados tabulados, foram feitos os cálculos da seguinte maneira:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{A}{A+C} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{D}{B+D} \times 100$$

$$\text{Concordância observada} = \frac{A+D}{N} \times 100$$

3. RESULTADOS

3.1. Casuística

Foram colhidas 336 amostras de pacientes, menores de 5 anos de idade, atendidos no H.U. da Universidade de São Paulo em 2003, por apresentarem DRA. Os critérios atribuídos às DRA foram sintomas respiratórios do tipo: Pneumonia, bronquiolite, laringite, broncoespasmo (BCE), broncopneumonia (BCP) e infecções das vias aéreas superiores (IVAs).

3.2. Isolamento em cultura de células.

O isolamento foi realizado de acordo com o descrito no **item 2.5**. O material foi inoculado sempre que possível, nas duas linhagens celulares (HEp-2 e Hela-I). Porém, nem sempre as duas linhagens estavam simultaneamente em perfeitas condições para o trabalho sendo que nessas ocasiões a inoculação era realizada somente em uma das linhagens. As **figura 17 e 18**, respectivamente, mostram um controle negativo de células Hep-2 não inoculadas e os sincícios, efeito citopático característico do HRSV, em células HEp-2 infectadas com a amostra padrão A2.

Fig.17: Controle negativo de células HEp-2 não inoculadas com vírus (aumento de 60x; fotografia tirada diretamente da placa de cultura de células, sem coloração).

Fig.18: Observação de sincícios em células HEp-2 inoculadas com a amostra padrão A2 do HRSV (aumento 60x; fotografia tirada diretamente da placa de cultura de células, sem coloração).

3.3 Diagnóstico pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI)

A imunofluorescência foi realizada tanto diretamente de material clínico quanto de material inoculado em cultura de células, apresentando ou não sincícios. O padrão de fluorescência, para os sete vírus estudados (HRSV, HPIV 1,2 e 3, Influenza A e B e Adenovírus), apresentam características bastante semelhantes. As **figura 19 e 20** ilustram, respectivamente, a leitura de um controle negativo de células HEp-2 não inoculadas e uma fluorescência típica resultante da infecção de células HEp-2 por vírus respiratórios, na qual observam-se as células positivas com fluorescência granular verde e as negativas com coloração vermelha.

Fig.19: Fotografia da IFI de células HEp-2 não inoculadas com vírus (controle negativo, aumento de 200x; lâmina gentilmente preparada pela Srta. Danila Vedovello)

Fig.20: Fotografia da IFI de células HEp-2 inoculadas com HRSV (aumento de 200x; lâmina gentilmente preparada pela Srta. Danila Vedovello)

3.4. Diagnóstico por GeneScan (GS)

O diagnóstico por GS foi realizado seguindo a metodologia descrita no **item 2.14**. A **figura 21** mostra um resultado típico gerado pelo GS. Em azul, os picos correspondentes aos produtos esperados para cada vírus estudado pelo painel de RT-PCR, cujos tamanhos foram previamente descritos na **tabela 2**; e em vermelho os picos do *sizestandard* (padrão de peso molecular).

Fig. 21: Eletroferograma obtido por GeneScan mostrando os produtos amplificados da RT-PCR de controles positivos para os vírus respiratórios em azul e o peso molecular (sizestandard) em vermelho corrido sob condições denaturantes. No eixo x a escala está em pares de bases e no eixo y em URF (unidade relativa de fluorescência). Tamanho dos fragmentos amplificados (em pb): HRSV=380, HPIV1=317, HPIV2=203, HPIV3=102, IA=192, IB=241, Adeno=167, HMPV=347, Pic=114-115.

3.5. Teste de sensibilidade do Genescan

Para testarmos a eficiência do GeneScan na detecção de fragmentos de DNA amplificado, utilizamos o HRSV como vírus padrão e comparamos sua detecção com o Gel de Agarose, uma das metodologias mais utilizadas atualmente. Diluições sucessivas a 1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/10 e pura de uma amostra de controle positivo foi submetida a um gel de agarose 1,5% e ao GeneScan, obtendo-se os resultados das figuras **22a** e **b**.

Pode-se notar na **fig.22a** que o controle positivo diluído 10 vezes quase não pode ser detectado através do gel de agarose, enquanto que através do GeneScan (**fig.22b**) observa-se apenas uma sutil diferença entre os resultados. Mostrando o GeneScan ser uma metodologia bastante sensível na detecção de produtos amplificados marcados com fluorescência.

Fig.22a: Fotografia de diluições seriadas de controle positivo de HRSV corados por brometo de etídio e corridas em gel de agarose 1,5% vistas sobre luz ultravioleta.

Fig.22b: Eletroferograma de diluições seriadas (1; 1/2; 1/4; 1/6; 1/8 e 1/10) de controle positivo de HRSV corridas no seqüenciador ABI310 e analisadas por GeneScan. Em vermelho o peso molecular (sizestandard) e em azul o pico representando a amostra.

3.6 Resultados obtidos pela GS RT-PCR

Das 336 amostras clínicas diagnosticadas pelo GeneScan, 74 foram negativas e 262 foram positivas para pelo menos um dos nove vírus respiratórios estudados, sendo 35,1% delas de infecções mistas de dois ou mais vírus concomitantes (co-infecções). Ao todo, foram encontrados 81 vírus Respiratório Sincicial, 60 Metapneumovírus, 28 vírus Parainfluenza III, 23 Adenovírus, 17 vírus Influenza A, 2 Parainfluenza I e 153 Picornavírus (**fig. 23**). Não foram encontrados os vírus Influenza B e Parainfluenza II.

Fig. 23: Quantidade de vírus encontrados na amostragem total, em número absoluto, por GeneScan.

3.7 Resultados obtidos pela IFI

O teste de IFI foi realizado tanto diretamente do material clínico, quanto de material inoculado em cultura celular. Das 336 amostras testadas, 6 foram inconclusivas, devido à falta de material clínico ou excesso de muco durante a preparação da lâmina de IFI, 235 foram negativas e 95 foram positivas para pelo menos um dos sete vírus respiratórios estudados, sendo que em apenas 2 amostras foi encontrado co-infecção. Ao todo, foram encontrados 63 vírus Respiratório Sincicial, 09 vírus Parainfluenza III, 23 Adenovírus e 2 vírus Influenza A (**fig. 24**).

Fig. 24: Quantidade de vírus encontrados na amostragem total, em número absoluto, por IFI de material clínico e/ou Cultura Celular.

3.8. Diagnóstico por GS x IFI das amostras clínicas de 2003

Excluindo-se as 6 amostras inconclusivas pela IFI, pudemos comparar o diagnóstico entre GS e IFI das amostras clínicas de 2003. As amostras foram diagnosticadas por ambas as técnicas para os vírus HRSV, HPIV 1 a 3, Influenza A e B e adenovírus, cujos resultados estão resumidos na **tabela 4**. Os resultados obtidos para HMPV e picornavírus não puderam ser comparados, pois foram detectados apenas por GS, visto a ausência de monoclonais para o teste de IFI dos mesmos.

Table 4: Total de vírus encontrados nas amostras pesquisadas pelas metodologias IFI e GS.

Resultados (GS / IF+CC)	Nº de amostras com os resultados						
	HRSV	HPIV 1	HPIV 2	HPIV 3	IA	IB	Adeno
+ / +	49	0	0	8	1	0	16
+ / -	32	2	0	20	16	0	07
- / +	14	0	0	1	1	0	07
- / -	241	334	336	307	318	336	306

3.9. Teste de sensibilidade, especificidade e concordância do múltiplo RT-PCR

Com os resultados descritos no item anterior, comparamos o GS e a IFI, tanto de material clínico quanto de cultura celular, com parâmetros de sensibilidade, especificidade e concordância no diagnóstico para cada vírus, de acordo com as tabulações e equações matemáticas descritas no **item 2.15**. Os valores obtidos estão representados na **tabela 5**. Os parâmetros não foram calculados para os picornavírus e HMPV, pois não foram previamente testados por IFI.

As técnicas foram comparadas tendo como referência (padrão ouro) a IFI feita do material clínico e/ou cultura de células. Para alguns vírus em que a IFI não encontrou casos positivos, alguns parâmetros não puderam ser calculados devido ao valor zero, nestes casos a tabela indica “nsa” (não se aplica).

Tabela 5: Comparação entre IFI e GS para os diferentes vírus.

IFI x GS	HRSV	HPIV1	HPIV2	HPIV3	IA	IB	Adeno
Concordância	86,3%	99,4%	100%	93,7%	94,9%	100%	95,8%
Especificidade	88,3%	99,4%	100%	93,9%	95,2%	100%	97,8%
Sensibilidade	77,8%	nsa	nsa	88,9%	50%	nsa	69,6%

3.10. Comparação entre GS, IFI e *semi-nested* PCR para a detecção do HRSV.

As amostras colhidas até novembro de 2003 também foram testadas por PCR seguida de *semi-nested* PCR de rotina do laboratório para o HRSV. Os resultados e a comparação entre as técnicas estão descritas nas **tabelas 6 e 7** respectivamente. Os parâmetros foram calculados obedecendo às tabulações do **item 2.15**, tendo o *semi-nested* PCR como metodologia de referência.

Tabela 6: Número absoluto de HRSVs detectados entre as técnicas de Semi-Nested PCR e GS e entre Semi-Nested PCR e IFI.

Resultados	<i>SemiNested</i> x GS	<i>SemiNested</i> x IFI
+/+	66	50
+/-	16	30
-/+	12	16
-/-	225	218
total	319	314

Tabela 7: Resultados da comparação entre as técnicas de SNested PCR e GS e de SNested PCR e IFI, tendo o *semi-nested* como referência.

HRSV	<i>SNested</i> x GS	<i>SNested</i> x IFI
Concordância	91,2%	85,3%
Especificidade	94,9%	93,1%
Sensibilidade	80,5%	62,5%

3.11. Diagnóstico de Coinfecções

A IFI detectou apenas duas amostras com infecção mista, sendo uma de HRSV e Influenza A e outra de HRSV e HPIV3, o que representa cerca de 2% das amostras positivas. Enquanto que o GS RT-PCR detectou dois ou mais vírus concomitantes em 92 amostras, cerca de 35,1% das amostras positivas.

Em 11 amostras foram encontrados três vírus ao mesmo tempo e em 81 amostras foram encontradas dois vírus concomitantes. O picornavírus estava presente em todos os casos de infecção tripla e na maioria (85% ou 68 amostras) das infecções dupla.

Depois do picornavírus o HRSV foi o vírus mais encontrado em coinfecções (44 amostras), seguido pelo HMPV (29 amostras). A lista completa com os resultados obtidos pelo GS pode ser observada a seguir (**fig. 25**).

Fig.25: Resultados de infecções simples e coinfeções obtidos pelo GS RT-PCR em 2003.

3.12. Sazonalidade dos vírus respiratórios

Levando-se em conta os resultados obtidos pelo GS RT-PCR e a data de recebimento das amostras, pudemos obter um gráfico do número de amostras positivas para cada uma das viroses estudadas por mês do ano (**fig.26**), que mostra a sazonalidade dos principais vírus respiratórios durante o ano de 2003.

Fig.26: Sazonalidade dos principais vírus respiratórios em 2003.

4. DISCUSSÃO

Estudos sobre etiologia viral das doenças respiratórias demonstram que os picornavírus, sobretudo o rinovírus, são os responsáveis pela maioria das infecções do trato respiratório superior, incluindo os resfriados comuns e otite média aguda (ARRUDA, 2000; NOKSO-KOIVISTO, 2004; SAVOLAINEN, 2003), contudo também podem causar infecções do trato respiratório inferior resultando em doenças severas principalmente em crianças (MCMILLAN, 1993; MONTO, 1995). Nossos primers foram desenhados para pegar a maioria das rinoviroses e algumas enteroviroses e paraechoviroses, estando nosso trabalho de acordo com a literatura, visto que o picornavírus foi a virose mais encontrada pelo GS, em 45,5% das amostras estudadas.

Nossos resultados obtidos pelo GS, para o picornavírus, foram bastante semelhantes aos obtidos por Nokso-Koivisto et al. 2004, que encontrou o rinovírus em 41 e 32% das amostras de fluido de nasofaringe e ouvido médio respectivamente, de crianças com otite média aguda.

Em nosso trabalho o picornavírus foi detectado ao longo de todo o ano, exceto em janeiro onde o número de casos de DRA foi bastante baixo, com ápice durante o outono-inverno.

Diferentemente dos picornavírus, o HRSV é o principal agente de infecções agudas do trato respiratório inferior durante a infância, sendo o principal responsável por um elevado índice de hospitalização de crianças com até 5 anos de idade (GLEZEN, 1986; CINTRA, 2001). No presente estudo, o HRSV foi o segundo agente respiratório mais encontrado, representando um total de 24% de todas as amostras e 30,9% dentre as positivas, resultado bastante semelhante ao encontrado por Gröndahl et al., 1999.

Em nossa comunidade a epidemia de HRSV apresenta uma sazonalidade bem clara e definida, ocorrendo anualmente no período de outono tardio, inverno ou início da primavera, mas não durante o verão. Cada epidemia dura cerca de cinco meses, com 40% dos casos ocorrendo durante os meses de pico (COLLINS, 1996). Esta sazonalidade descrita por Collins *et al.* adapta-se perfeitamente ao presente estudo, no qual o pico da virose se deu em maio, com casos escassos em meses mais quentes.

Assim como o HRSV, o HMPV tem sido cada vez mais relacionado as DRAs. O HMPV é um vírus recém descoberto que induz sintomas parecidos ao do HRSV, variando de infecções do trato respiratório superior a severas bronquiolites e pneumonias. O HMPV foi o terceiro vírus mais encontrado neste estudo (17,8% de todas as amostras), respondendo por 13% das infecções simples. Resultado bastante semelhante ao encontrado por Galiano *et al.* 2004, que estudou amostras previamente diagnosticadas negativas para HRSV, adenovírus, influenza e parainfluenza por IFI de rotina na Argentina, encontrando o HMPV em 11% delas. Possivelmente essa porcentagem foi um pouco menor do que a encontrada no presente trabalho, devido às coinfeções que ele não detectou por estudar apenas amostras negativas para os outros vírus. Em nosso estudo o HMPV estava presente em 31,5% das coinfeções.

Ainda comparando os resultados aos de Galiano, assim como nós, ele encontrou uma maior freqüência de detecção do HMPV durante a primavera. Até hoje, nenhum estudo sobre a sazonalidade do HMPV no Brasil foi publicado. Apenas um trabalho foi feito, descrevendo as características clínicas e epidemiológicas das infecções respiratórias agudas envolvendo o HMPV e HRSV em crianças do nordeste do Brasil, durante os meses de maio e junho de 2002. Neste trabalho, Cuevas *et al.* 2003, encontrou uma porcentagem de 17% de HMPV e 7% de coinfeção de HMPV e HRSV, muito semelhante aos nossos dados, o que sugere uma circulação homogênea deste vírus em todo território nacional.

Dentre os vírus parainfluenza, os mais detectados foram os do tipo 3, encontrado em 28 amostras (8,3% do total de amostras). O HPIV do tipo 2 não foi detectado e o do tipo 1 foi detectado em apenas duas amostras, correspondendo a menos de 1% das infecções. Estes resultados estão de acordo com a literatura, na qual o tipo 3 é o mais detectado dentre os HPIVs (ERDMAN, 2003; GRONDAHL, 1999) e os tipos 1 e 2 não são detectados ou aparecem em pouquíssimas amostras (FAN, 1998; HINDIYEH, 2001; KEHL, 2001).

As duas amostras positivas para HPIV 1 foram colhidas durante o inverno, assim como a maioria das amostras positivas para HPIV 3, cujo pico da virose se deu no final do inverno / início da primavera, logo após a queda dos picos do HRSV e do HMPV.

Os vírus da influenza também foram pouco detectados, sendo que o tipo B não foi detectado por nenhuma das técnicas utilizadas. Segundo a literatura o tipo B responde por apenas 0,2% das infecções por influenza, enquanto que o tipo A responde pelos restantes 99,8% das infecções (CDC, 2000). Ao todo, 18 amostras apresentavam o vírus influenza A, sendo que destas 17 por GeneScan e apenas 2 por IFI. A grande maioria das amostras positivas para Influenza A foram colhidas durante seu pico de incidência no final do outono / início do inverno, logo após a queda do pico de HRSV.

O adenovírus foi encontrado ao longo de todo ano em 23 amostras, ou seja, em 6,8% de todas as amostras, com maior incidência no final do inverno e durante a primavera. Trata-se de uma porcentagem um pouco abaixo do esperado, uma vez que na literatura esta porcentagem gira em torno dos 10%, justificada pela baixa sensibilidade do GS RT-PCR para a detecção de adenovírus em amostras clínicas quando comparado à IFI de cultura celular devido à possível presença de inibidores provenientes da amostra clínica. Além disso, os adenovírus possuem um prolongamento de seu genoma que ficam ligados covalentemente às proteínas, tal ligação só pode ser quebrada com adição de proteinases, caso contrario grande parte do DNA fica ancorado na interfase protéica ou perdida na fase fenólica durante a extração por Trizol (SANALIOS, 2004). Para evitar esta perda na quantidade de DNA extraído, um novo protocolo (Anexo 3) de extração do DNA viral para o adenovírus foi utilizado em amostras positivas por IFI e negativas por GS. Dentre 8 amostras repetidas a partir da extração pelo novo protocolo (método de Shinagawa), 5 deixaram de ser negativas e foram positivas para adenovírus pelo GS RT-PCR, melhorando a taxa de positivos para adenovirus em 21,7%.

Uma das potenciais vantagens do uso de uma técnica de *multiplex* é a habilidade de detectar coinfeções (HINDIYEH, 2001). Atualmente a freqüente divulgação de dupla infecção respiratória viral varia amplamente, mas a importância de tais infecções não está resolvida, muitos trabalhos têm reportado a falta de conhecimento sobre as coinfeções (DREWS, 1997; KEHL, 2001; HINDIYEH, 2001). A detecção de dupla infecção, geralmente depende de quantas técnicas de diagnóstico são utilizadas. No estudo de Drews et al. 1997, quando a cultura de células foi utilizada como única técnica de

diagnóstico, a taxa de dupla infecção respiratória viral foi 1,9%. Quando cultura, teste sorológico e PCR foram usados, a taxa de dupla infecção foi de 11,6%.

Em nosso estudo o GS aplicado sobre o múltiplo RT-PCR foi capaz de detectar 92 amostras com dois ou mais vírus concomitantes, o que corresponde a uma taxa de 27,4% de coinfeções. Por isso, foi difícil atribuir uma causa única à enfermidade nestes casos de coinfeções, onde cada resultado positivo e negativo foi considerado independentemente durante a análise.

A taxa de coinfeções foi bastante elevada quando comparada à literatura, mas presumível, quando consideramos que o multiplex PCR é uma das melhores ferramentas na detecção de coinfeções (KEHL, 2001; HINDIYEH, 2001). Além disso, a técnica utilizada por nós foi capaz de detectar uma variedade maior de vírus que a maioria das técnicas citadas na literatura, o que aumentou a taxa de coinfeções, principalmente pela inclusão dos picornavírus nessa metodologia. Na literatura quando os picornavírus são estudados, as taxas de positividade e de coinfeções são bastante discrepantes em relação a estudos que não os consideram.

Dentre as coinfeções o picornavírus estava presente em 86,8% delas, sendo que em 12% das coinfeções foram encontrados três viroses concomitantes, e o picornavírus estava presente em todas elas. Excluindo-se os picornavírus, a taxa de coinfeções cai para 6,8% do total de amostras. Devemos considerar nesses resultados, a vacinação contra a poliomielite, que utiliza a vacina Sabin composta com picornavírus (poliovírus) vivos atenuados, que poderiam estar sendo excretados no momento da coleta.

Em recente publicação Weinberg *et al.* 2004, comparou taxas de detecção de viroses respiratórias pela RT-PCR e pela cultura de células convencional, demonstrando que a RT-PCR incrementou o rendimento de identificação viral em duas vezes. O autor, assim como nós, utilizou o GS como método de detecção de seus produtos, porém, não utilizou uma metodologia de referência para fazer comparações quanto à concordância, especificidade e sensibilidade, e sim, controles positivos para diversos vírus para testar a inespecificidade e diluições seriadas para testar a sensibilidade da técnica.

Em nosso estudo, comparando as diferentes técnicas, GS e IFI direto de material clínico e/ou cultura celular, encontramos que a média das

concordâncias obtidas para os diferentes vírus em relação à IFI foi em torno de 95,7%, a especificidade 96,4% e a sensibilidade 71,6%. Em muitos casos a sensibilidade não pôde ser calculada, pois o vírus em questão não foi detectado pela técnica de referência.

Nos casos em que foi possível calcular a sensibilidade, ela se mostrou moderada, sobretudo em relação ao Adenovírus. A discrepância nos resultados pode ser explicada em parte pelo grande aumento na sensibilidade da IFI proporcionado pela somatória das sensibilidades da IFI de material clínico e a IFI de cultura celular, que no caso dos adenovírus é a metodologia de eleição até o momento. A leitura das lâminas de IFI, muitas vezes, é subjetiva, cansativa e depende da presença de uma pessoa experiente e bem treinada (TAKAHASHI, 2001), fato que aumenta a possibilidade de falsos positivos. Além disso, a já comentada presença de inibidores em amostras clínicas, deve ser considerada.

Apesar da sensibilidade ter se mostrado moderada quando adotamos a IFI como técnica de referência, ao analisarmos separadamente, percebemos que a RT-PCR foi capaz de detectar um número maior de amostras positivas para todas as viroses estudadas por ambas as técnicas. Enquanto a IFI detectou 97 vírus respiratórios, o GS detectou 151 deles mais as amostras positivas para HMPV e picornavírus que não foram detectados por IFI. Reduzindo neste estudo a porcentagem de amostras negativas de 69,9% (235 amostras) para 22% (74 amostras).

Inclusive quando a screening RT-PCR foi comparada com a técnica de semi-nested PCR de rotina para o vírus HRSV, a concordância, a especificidade e a sensibilidade da nova técnica aumentaram, mostrando que todos estes parâmetros estão mais próximos da técnica de *nested*-PCR, uma metodologia comprovadamente mais sensível que a IFI (TAKAHASHI, 2001).

Caso tivéssemos utilizado apenas o GS como metodologia de diagnóstico, teríamos deixado de detectar 14 amostras que foram positivas para HRSV pela IFI. Porém, se utilizássemos apenas a IFI, teríamos perdido 32 amostras positivas para o HRSV. Considerando a detecção do influenza, o GS teria perdido uma amostra enquanto que a IFI teria deixado de detectar 16 amostras positivas. No caso dos HPIVs, o GS deixaria de detectar uma amostra com o HPIV3, enquanto que a IFI não detectaria duas amostras

positivas para HPIV1 e 20 amostras positivas para HPIV3. Apenas no caso dos adenovírus o GS e a IFI deixariam de detectar o mesmo número de amostras, ambas teriam deixado de detectar 7 amostras, positivas para o adenovírus, cada.

As amostras que foram positivas por GS RT-PCR, mas negativas por IFI poderiam representar falso-positivos, contudo, com todos os cuidados tomados para evitar contaminações e as inúmeras evidências sugerem que os resultados positivos por GS eram de fato positivos. Os casos de HRSV foram confirmados pela *semi-nested* PCR de rotina do laboratório. Todas as amostras positivas para Influenza e HPIV3 foram re-analisadas no GS, separadamente, evitando a possibilidade de produtos inespecíficos e as 16 amostras positivas para influenza A foram confirmadas por outra reação de RT-PCR previamente padronizada em nosso laboratório (SOARES, 2002). Por fim, as características epidemiológicas dos resultados positivos pelo GS foram notavelmente similares aos da literatura (em relação a sazonalidade, distribuição e duração dos surtos).

Os resultados obtidos pelo GS RT-PCR, além de corresponderem muito bem aos dados publicados de epidemiologia e espectro da doença dos vírus estudados, nos forneceram dados importantes para um melhor entendimento da etiologia e epidemiologia das infecções respiratórias agudas em crianças de até cinco anos atendidas no H.U. (Hospital Universitário – USP, São Paulo) durante o ano de 2003.

A padronização da reação de GS RT-PCR apresentou dificuldades na execução, inerentes a técnica, por se tratar de um multiplex para o diagnóstico de nove vírus diferentes. Ao fazermos um *pool* com os produtos de PCR para serem analisados no GS, tivemos que adaptar a técnica de precipitação de DNA por isopropanol para purificarmos as amostras.

Outra dificuldade encontrada foi que algumas amostras não puderam ser diagnosticadas pela IFI direta de material clínico devido ao pouco número de células e/ou a presença de muco, e outras não puderam ser diagnosticadas pela IFI de cultura celular devido a sucessivas contaminações do meio de cultura. Por essa razão tivemos que juntar os resultados da IFI de material clínico com a IFI de cultura celular para podermos comparar com a técnica de GS.

Para finalizar, uma técnica de diagnóstico rápida ideal deve possuir baixo custo-efetivo e ser de fácil performance.

Os custos financeiros são bastante subjetivos e por isso serão abordados de forma comparativa. A própria reação de PCR é considerada uma técnica cara quando comparada a outras técnicas consideradas não bio-moleculares como a IFI ou sorologia. Como o múltiplo RT-PCR é um painel de várias reações de PCR para diferentes vírus num sistema, seu custo final é elevado, porém, menor que o custo da somatória das IFIs realizadas a partir do material clínico e suas respectivas passagens em cultura celular. O GS utilizado para analisar os produtos gerados no múltiplo RT-PCR, também deve ser levado em consideração, sobretudo pelo alto valor do equipamento (ABI PRISM 310, seqüenciador de DNA). Entretanto, uma vantagem do GS RT-PCR é a ausência de um Kit específico, como é o caso da própria IFI e do Hexaplex (Prodesse) utilizado por Hindiyeh et al. 2001, para a detecção de sete viroses respiratórias. Os Kits encarecem, em muito, as reações devido a seus altos custos e a inclusão de *royalties*. Além disso, por não se tratar de um Kit, o GS RT-PCR pode ser facilmente modificado para a detecção de outras viroses, bastando modificar os *primers*.

Outra vantagem é a alta sensibilidade provida pelo GS que dispensa o uso da *nested*-PCR, evitando seu inerente risco de contaminação e economizando tempo, reagentes e mão de obra.

O tempo no diagnóstico é um fator crucial para medidas efetivas individuais ou coletivas no tratamento das infecções respiratórias, sendo assim de extrema importância a economia de tempo proporcionada pelo GS RT-PCR quando comparada à cultura celular.

5. CONCLUSÕES

- O GS RT-PCR ofereceu um rápido, sensível e específico método de detecção das viroses respiratórias mais comuns em crianças jovens, o que é clinicamente crucial para reduzir o potencial de transmissão nosocomial para pacientes de alto-risco, para limitar o uso desnecessário de antibióticos, e para direcionar a terapia para um diagnóstico específico.
- O GS RT-PCR se mostrou uma importante ferramenta na detecção de coinfeções, podendo contribuir ativamente na elucidação da frequência e importância clínica bem como da severidade destas, ainda tão subestimadas em nosso meio.
- O GS RT-PCR mostrou ser também um método útil como ferramenta de diagnóstico em estudos de vigilância epidemiológica para vírus respiratórios circulantes em nossa comunidade, contribuindo para uma melhor compreensão da circulação desses vírus no Brasil.

6. BIBLIOGRAFIA

ADRIAN, T.; WIGAND, R. Restriction site mapping of subgenus D Adenoviruses, Prototypes 42-47, intermediate and atypical strains. *Zbl. Bakt. Int. J. Med. Microbiol.*, 276(1): 107-19, 1992.

AGUILAR, J.C.; PEREZ-BRENA, M.P.; GARCIA, M.L.; CRUZ, N.; ERDMAN, D.D.; ECHEVARRIA, J.E. Detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 in clinical samples of pediatric patients by multiplex reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38:1191-1195. 2000.

ANDERSON, L. J.; HIERHOLZER, J. C.; TSOU, C.; HENDRY, R. M.; FERNIE, B. F.; STONE, Y. & MCINTOSH, K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.*, **151**: 626-633, 1985.

ANDERSON, L. J.; HENDRY, R. M.; PIERIK, L. T.; TSOU, C. & MCINTOSH, K. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.*, **163**: 687-692, 1991.

ARMITAGE, P; BERRY, G. Statistical Methods in Medical Research, 3rd edition, Blackwell Science Ltd, Oxford, England, UK, 1994.

ARRUDA, E.; HAYDEN, F.G. Paramyxovirus (Parainfluenza, Mumps, Measles, and Respiratory Syncytial Virus), Rubella Virus, Coronavirus, and Adenovirus Infections. In Stein JH, e cols (Eds). *Internal Medicine* 5th Ed. Mosby, Inc, St Louis, p.1494-1497, 1998.

ARRUDA, E. Rhinoviruses. In *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press. Vol.4, p.97-108, 2000.

AZEVEDO, A. M. N. Detecção de vírus respiratórios nas crises asmáticas em crianças São Paulo, Dissertação (Mestrado) FM – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1998.

BAUM, S.G. Adenovirus In Mandell, G.L.; Benett, J.E.; Dolin, R.. **Principles and Practice of Infectious Diseases 4**. P 1382-7, ed. 1995.

BEDOYA, V.I; ABAD, V.; TRUJILLO, H. Frequency of respiratory syncytial virus in hospitalized infants with lower acute respiratory tract infection in Colombia. *Ped. Infect. Dis.J.* v15 : 1123-4, 1996.

BENKO, M; HARRACH, B; RUSSEL, WC. Adenoviridae. In: ICTVdB – The Universal Virus Database, version 3. Buchen-Osmond, C. (Ed), ICTVdB Management, Columbia University, The Earth Institute, Biosphere 2 Center, Oracle, AZ, USA. 1999.

BETTS, R.F. Influenza virus In Mandell, G.L.; Benett, J.E.; Dolin, R., ed. **Principles and Principles and Practice of Infectious Diseases 4**. P 1546-67, ed. 1995.

BRANDT, C.D.; HYUN, W.K.; VARGOSKO, A.J. Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. 1. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. **Am. J. Epidemiol.** v90 : 484-96, 1969.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Update: Influenza Activity: United States, 1999-2000 season. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** 9: 173-177, 2000.

CHANOCK, R. M.; FINBERG, L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. **Am. J. Hyg.**, **66**: 281-290, 1957a.

CHANOCK, R. M.; FINBERG, L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiological aspects of infection in infants and young children. **Am. J. Hyg.**, **66**: 291-300, 1957b.

CHYTIL, F. The lungs and vitamin A. **Am J Physiol** 6:5217-527, 1992.

CINTRA, O.A.; OWA, M.A.; MACHADO, A.A.; CERVI, M.C.; FIGUEIREDO, L. T.; ROCHA, G.M.; SIQUEIRA, M.M.; ARRUDA, E. Occurrence and severity of infections caused by subgroup A and B respiratory syncytial virus in children in southeast Brazil. **J Med Virol.** 65(2):408-12, 2001.

CLAAS, E.C.J.; SPRENGER, M.J.W.; KLETER, G.E.M.; VAN BEEK, R.; QUINT, W.G.V.; MASUREL, N. Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods** 39 : 1-13, 1992.

COLLINS, P. L.; MCINTOSH, K. & CHANOCK, R. M. Respiratory syncytial virus. In B. N. Fields (ed.), *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996

CUEVAS, LE; NASSER, AM; DOVE, W; GURGEL, RQ; GREENSILL, J; HART, CA. Human Metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 9(12):1626-8. 2003.

DIXON, R.E. Economic costs of respiratory infections in the United States. **Am. J. Med.** **78** (Suppl. 6B) : 45-51, 1985.

DOERFLER W, BÖHM P. (Eds) The molecular repertoire of adenoviruses. **Current Topics in Microbiology & Immunology**, Vol. 199 (1995). Part 1: Virion structure & infection; Part 2: Molecular biology of virus-cell interactions; Part 3: Biology & pathogenesis [inc. gene therapy].

DONOWITZ, G.R.; MANDELL, G.L. Acute pneumonia. In Mandell, G.L.; Benett, J.E; Dolin, R., ed. **Principles and Practice of Infectious Diseases** 4. P619-37, ed. 1995.

DURBIN AP, KARRON RA. Progress in the development of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. **Clin Infect Dis.** 15;37(12):1668-77. 2003.

ECHEVARRIA, J.E.; ERDMAN, D.D.; SWIERKOSZ E.M.; HOLLOWAY, B.P.; ANDERSON, L.J. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3- from clinical samples by multiplex PCR. **J Clin Microbiol** 36: 1388-1391. 1998.

EDWARDS, K.M.; THOMPSON, J.; PAOLINI, J.; WRIGHT, P.F. Adenovirus infections in young children. **Pediatr.** v76 : 420-4, 1985.

ERDMAN, D.D.; WEINBERG, G.A.; EDWARDS, K.M.; WALKER, F.J.; ANDERSON, B.C.; WINTER, J.; GONZÁLEZ, M.; ANDERSON, L.J. GeneScan Reverse Transcription-PCR assay for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. **J Clin Microbiol** 41: 4298-4303. 2003.

EUGENE-RUELLAN, G.; FREYMUTH, F.; BAHLOUL, C.; BADRANE, H.; VABRET, A.; TORDO, N. Detection of respiratory syncytial virus A and B and parainfluenzavirus 3 sequences in respiratory tracts of infants by a single PCR with primers targeted to the L-polymerase gene and differential hybridization. **J. Clin. Microbiol.** 36:796-801. 1998.

FALSEY AR, ERDMAN D, ANDERSON LJ, WALSH EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. **J Infect Dis.** 187(5):785-90. 2003.

FAN, J.; HENRICKSON, K. Rapid diagnosis of human parainfluenza virus type 1 infection by quantitative reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay. **J. Clin. Microbiol.** 34 : 1914-1917, 1996.

FAN, J.; HENRICKSON, K.J.; SAVATSKI, L.L. Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and B, influenza viruses A and B, and human parainfluenza virus types 1, 2, and 3 by multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridization assay (Hexaplex). **Clin. Infect. Dis.** 26:1397-1402. 1998.

FENTON C, SCOTT LJ, PLOSKER GL. Palivizumab : A Review of its Use as Prophylaxis for Serious Respiratory Syncytial Virus Infection. **Paediatr Drugs.** 6(3):177-197. 2004.

GALIANO, M; VIDELA, C; PUCH, SS; MARTINEZ, A; ECHAVARRIA, M; CARBALLAL, G. Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. **J Med Virol.** 72(2):299-303. 2004.

GARENNE, M.; RONSMANS, C.; CAMPBELL, H. The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries. **World Health Stat. Q.** 45 : 180-191, 1992.

GAYDOS, C.A.; QUINN, T.C.; EIDEN, J.J. Identification of *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene. **J. Clin. Microbiol.** 30 : 796-800, 1992.

GILBERT, L.L.; DAKHAMA, A.; BONE, B.M.; THOMAS, E.E.; HEGELE, R.G. Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel. **J. Clin. Microbiol.** 34 : 140-143, 1996.

GIMENEZ, H. B.; HARDMAN, N.; KEIR, H. M.; CASH, P. Antigenic variation between human respiratory syncytial virus isolates. **J. Gen. Virol.**, 67 : 863-870, 1986.

GLEZEN, W.P.; TABER, L.H.; FRANK, A.L.; KASEL, J.A. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. **Am.j.Dis.Child**, 140: 543-546, 1986.

GREENOUGH, A. Recent advances in the management and prophylaxis of respiratory syncytial virus infection. **Acta Paediatr Suppl.** 90(436):11-4, 2001.

GRODAHL, B.; PUPPE, W.; HOPPE, A.; KUHNE, I.; WEIGL, J.A.I.; SCHMITT, H-J. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: Feasibility study. **J Clin Microbiol** 37:1-7. 1999.

GUY, RJ; NATALE, RD; KELLY, HA; LAMBERT, SB; TOBIN, S; ROBINSON, PM; TALLIS, G; HAMPSON, W. Influenza outbreaks in aged-care facilities: staff vaccination and the emerging use of antiviral therapy. **Med J Aust.** 180(12): 640-642, 2004.

GWALTNEY, J.M.; HANINZ, B.A. Rhinovirus. In Rickman DD, Whittey RJ, Hayden FG (Eds). **Clinical Virology** 2nd Ed. ASM Press, Washington, p.995-1018, 2002.

HALL, C.B. (b) Parainfluenza viruses In Feigin, R.D.; Cherry, J.D. ed. **Textbook of pediatric infectious diseases 2.** P1632-46, ed. 1987.

HALL, C. B.; WALSH, E. E.; SCHNABEL, K. C.; LONG, C. E.; MCCONNOCHIE, K. M.; HILDRETH, S. W. & ANDERSON, L. J. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. **J. Infect. Dis.**, 162: 1283-1290, 1990.

HALL, C.B.; MCCARTHY, C.A. Respiratory Syncytial virus. In Mandell, G.L.; Benett, J.E.; Dolin, R., ed. **Principles and Practice of Infectious Diseases 4.** P1501-19, ed. 1995.

HEIN, N. Epidemiological aspects of the respiratory viruses infection in a pediatric ward. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1997.

HEMMING, V.G. Viral respiratory diseases in children: classification, etiology, epidemiology and risk factors. **J.Pediatr.** v124 : S13-6, 1994.

HENDRY, R. M.; PIERIK, L. T. & MCINTOSH, K. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987. **J. Infect. Dis.**, **160**: 185-190,1989.

HENRICKSON, K.J. 1994. Lower respiratory viral infection in immunocompetent children, p. 59-96, *In* **S.C. Aronoff (ed.)**, Advances in pediatric infectious diseases. Chicago: Mosby- Year Book.

HENRICKSON, K.; RAY, R.; BELSHE, R. Parainfluenza viruses. In Mandell, G. L.; Benett, J.E.; Dolin, R., ed. **Principles and Practice of Infectious Diseases** 4. P1489-96, ed. 1995.

HERMANN, K.L. Antibody detection. p. 77, *In* E.H. Lennette, P. Halonen, and F.A. Murphy (ed.), Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases, Principles sand Practice: Volume II, Viral, Rickettsial, and Chlamydial Diseases, Springer-Verlag, New York. 1988.

HIERHOLZER, J.C.; HALONEN, P.E.; DAHLEN, P.O., BINGHAM, P.G.; MCDONOUGH, M.M. Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry. **J. Clin. Microbiol.** 31 : 1886-1891, 1993.

HINDIYEH, M.; HILLYARD, D.R.; CARROLL, K.C. Evaluation of the Prodesse Hexaplex multiplex PCR assay for direct detedtion of seven respiratory viruses in clinical specimens. **Am. J. Clin. Pathol.** 116:218-224. 2001.

HINMAN, A.R. Global progress in infectious diseases control. **Vaccine** 16:1116-1121, 1998.

HORWITZ, M.S. Adenoviruses and their replication. In: **VIROLOGY**, Ed. B.N. Fields, New York, Raven Press, p.433-76, 1985.

HUSSEY, G.D.; KLEIN, M. A randomized, controlled trial of vitamin A in children with severe measles. **N Engl J Med** 323:160-164, 1990.

KASHIWA, H; SHIMOZONO, H; TAKAO, S. Clinical Pictures of Children with Human Metapneumovirus Infection: Comparison with Respiratory Syncytial Virus Infection. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 57, 80-82, 2004.

KARRON, R.A.; O'BRIEN, K.L.; FROEHLICH, J.L.; BROWN, V.A. Molecular epidemiology of a parainfluenza type 3 virus outbreak on a pediatric ward. **J. Infect. Dis.** 167 : 1441-1445, 1992.

KEHL, K.J.; HENRICKSON, K.J.; HUA, W.; FAN, J. Evaluation of the hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. **J Clin Microbiol** 39: 1696-1701. 2001.

LAMB, R.A. and KOLAKOFSKY, D. Paramyxoviridae: The viruses and Their Replication. **Fieldz Virology** 3rd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1177-1203, 1996.

LAMB, R.A. and KRUG, R.M. Orthomyxoviridae: The viruses and Their Replication. **Fieldz Virology** 3rd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1353-1395, 1996.

LINDQUIST, S.W.; DARNULE, A.; ISTAS, A.; DEMMLER, G. Parainfluenza vírus type 4 infections in pediatric patients. **Pediatr. Infect. Dis J.** v16: 34-8, 1997.

MAZZULLI T, PERET TC, MCGEER A, CANN D, MACDONALD KS, CHUA R, ERDMAN DD, ANDERSON LJ. Molecular characterization of a nosocomial outbreak of human respiratory syncytial virus on an adult leukemia/lymphoma ward. **J Infect Dis.** 180(5):1686-9. 1999.

MCINTOSH, K. AND CHANOCK, R. M. Respiratory syncytial virus. **B. N Virology. Raven Press Ltd., New York.** Fields (ed.) p. 1045-1072 1990.

MCMILLAN, J. A., L. B. WEINER, A. M. HIGGINS, AND K. MACKNIGHT. 1993. Rhinovirus infection associated with serious illness among pediatric patients. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 12:321–325.

MOGYOROS, M. Challenges of managed care organizations in treating respiratory tract infections in an age of antibiotic resistance. **Am J Manag Care.** 7(6 Suppl):S163-9, 2001.

MONTO, A. S., AND A. AULOR.. Viral respiratory infections in the community: epidemiology, agents and interventions. **Am. J. Med.** 89:245–275, 1995.

MUFSON, M. A.; ÖRVELL, C.; RAFNAR, B.; NORRBY, E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **J. Gen. Virol.**, 66: 2111-2124, 1985.

NISSEN MD, SIEBERT DJ, MACKAY IM, SLOOTS TP, WITHERS SJ. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. **Med J Aust.** 176(4):188. 2002.

NOKSO-KOIVISTO, J.; RATY, R.; BLOMQVIST, S.; KLEEMOLA, M.; SYRJANEN, R.; PITKARANTA, A.; KILPI, T.; HOVI, T. Presence of specific virases in the middle ear fluids and respiratory secretions of young children with acute otitis media. **J Med Virol.** 72: 241-8, 2004.

OSIOWY, C. 1998. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. **J. Clin. Microbiol.** 36:3149-3154.

PATON, A.W.; PATON, J.C.; LAWRENCE, A.J.; GOLDWATER, P.N.; HARRIS, R.J. Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates

by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. **J. Clin. Microbiol.** 30 : 901-904, 1992.

PERET, T.C.; BOIVIN, G.; LI, Y.; COUILLARD, M.; HUMPHREY, C.; OSTERHAUS, A.D.; ERDMAN, D.D.; ANDERSON, L.J. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. **J Infect Dis.** 185:1660-3. 2002.

RACANIELLO, V.R. Picornaviridae: The viruses and Their Replication. Knipe and Howley. **Fieldz Virology** 4th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 685-722, 2001.

ROSSMAN, M.G.; ARNOLD, E.; ERICKSSON, J.W. The structure of a human common cold virus (rhinovirus 14) and it is functional relations to other picornaviruses. **Nature.** 317: 145-153, 1985.

SANALIOS, R. B. Analise comparativa das técnicas de imunofluorescência indireta, isolamento em cultura celular e reação em cadeia de polimerase no diagnóstico de infecções respiratórias por adenovírus e vírus respiratório sincicial. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2004.

SAVOLAINEN, C.; BLOMQVIST, S.; HOVI, T. Human rhinoviruses. **Paediatr Respir Rev.** 4: 91-8, 2003.

SCHUTZE, G.E; JACOBS, R.F. Lower respiratory tract infections of infants and children. In Niederman, M.S.; Sarosi, G.; Glassroth, J. ed., **Respiratory infections – A scientific basis for management.** P.103-13, 1994.

SERWINT, J.R; MILLER, R.M. Why diagnose influenza infections in hospitalized pediatric patients? **Pediatr. Infect. Dis.J.** v12 : 200-4, 1993.

SOARES, P.B.M. Padronização da RT-PCR duplex para detecção dos vírus da influenza A e doença de Newcastle em aves migratórias. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2002.

SPENCER, M.J.; CHERRY, J.D. Adenoviral infections In Feigin, R.D.; Cherry, J.D. ed. **Textbook of pediatric infectious diseases** 2. P 1688-708, ed. 1987.

SUTMOLLER, F.; ANDRADE FERRO, Z. P.; ASENÍ, M. D.; FERREIRA, V.; MAZZEI, I. S.; CUNHA, B. L. Etiology of acute respiratory tract infections among children in a combined community and Hospital study in Rio de Janeiro. **Clin. Inf. Dis.**, 20: 854-860, 1995.

TAKAHASHI, V.N. van O.; BOTOSSO, V.F.; QUEIROZ, D.A.O.; CRISPIM, A.D.; VIEIRA, S.E.; LOPES, C.L.; CACHARRO, A.L.; DURIGON, E.L.; EJZEMBERG, B.; STEWIEN, K.E. Occurrence of respiratory syncytial virus groups A and B in São Paulo City, Brazil, 1995-1997. **Livro de Resumos do IXth National Meeting of Virology**, São Lourenço, 1998, p.133.

TAKAHASHI, V.N. van O.; BOTOSSO, V.F.; PERINI, A.P.; PERET, T.C.T.; VIEIRA, S.E.; GILIO, A.E.; EJZEMBERG, B.; STEWIEN, K.E.; DURIGON, E.L. Occurrence of respiratory syncytial virus groups A and B in São Paulo City, Brazil, 1998/1999. **Livro de Resumos do 11th National Meeting of Virology AND 3rd Mercosul Meeting of Virology**, São Lourenço, 2000, p.189.

TAKAHASHI, V. N. van O. Correlação entre os tipos A e B de vírus respiratório sincicial humano (HRSV) e a gravidade das infecções respiratórias em crianças. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2001.

TRISTAM, D.A.; WELLIVER, R.C. Respiratory syncytial virus. In E. H. Lennette, D. A. Lennette and E. T. Lennette (eds), Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and clamydial infections, 7th ed., **American Public Health Association**, Washington, p.539-552, 1995.

TURNER, R.B. Nosocomial viral respiratory infections in pediatric patients. In Mayhall, C.G. ed., **Hospital Epidemiology and Infection control**. P.485-93, 1996.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. 1992. Pneumonia ; 3,5 million deaths. In The state of the world's children. United Nations Children's Fund, 1993. Oxford University Press for Oxford, United Kingdom.

van ELDEN, L.J.; VAN KRAAIJ, M.G.; NIJHUIS, M.; HENDRIKSEN, K.A.; DEKKER, A.W.; ROZENBERG-ARSKA, M.; van LOON, A.M. Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory viruses in adults with hematological cancer and pneumonia. **Clin. Infect. Dis.** 34:177-183. 2002.

van den HOOGEN, B.G.; BESTEBROER, T.M.; OSTERHAUS, A.D.; FOUCHIER, R.A. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. **Virology** 295, 119–132. 2002.

van den HOOGEN, B.G.; de JONG, J.C.; GROEN, J.; KUIKEN, T.; de GROOT, R.; FOUCHIER, R.A.; OSTERHAUS, A.D. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nat. Med.** 7, 719–24. 2001.

van REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. **Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, San Diego, 1167pp , 2000.

WEINBERG, GA.; ERDMAN, DD.; EDWARDS, KM.; HALL, CB.; WALKER, FJ.; GRIFFIN, MR.; SCHWARTZ, B. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children.(Brief Report) **Journal of Infectious Diseases** v189 i4 p706(5), 2004.

WEST, A.; DAKHAMA, A.; KHAN, M.A.; VEDAL, S.; HEGELE, R.G. Community study using a polymerase chain reaction panel to determine the prevalence of common respiratory viruses in asthmatic and nonasthmatic children. **J. Asthma** 36:605-612. 1999.

WILLIAMS, J.V.; HARRIS, P.A.; TOLLEFSON, S.J.; HALBURNT-RUSH, L.L.; PINGSTERHAUS, J.M.; EDWARDS, K.M.; WRIGHT, P.F.; CROWE, J.E. Jr. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. **N Engl J Med.** 350: 443-50. 2004.

WOO, P.C.; CHIU, S.S.; SETO, W.H.; PEIRIS, M. Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in pediatric patients. **J. Clin. Microbiol.** 35 : 1579-1581, 1997.

WRIGHT, P.F. Respiratory diseases. **Viral Pathogenesis** 2nd Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 703-711, 1997.

XU, W.; ERDMAN, D.D. Type-specific identification of human adenovirus 3, 7, and 21 by a multiplex PCR assay. **J Med Virol.** 64:537-42. 2001.

XU, Z.; KUANG, M.; OKICKI, J.R.; CRAMER, H.; CHAUDHARY, N. Potent inhibition of respiratory syncytial virus by combination treatment with 2-5A antisense and ribavirin. **Antiviral Res.** 61(3):195-206. 2004.

ZAHRADNIK, J.M.; CHERRY, J.D. Influenza Viruses In Feigin, R.D.; Cherry, J.D. ed. **Textbook of pediatric infectious diseases**2. P1709-29, ed. 1987.

ANEXO 1: Termo de consentimento pós-informado

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: *VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE VÍRUS RESPIRÁTORIOS HUMANOS EM AMOSTRAS CLÍNICAS PELA TÉCNICA DE GENESCAN-RT-PCR.*

Seu filho está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo, então leia atentamente e caso tenha dúvidas, vou esclarece-las (se não souber ler, fique tranquilo(a) que leio para você). Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início a pesquisa. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você, nem ao seu (sua) filho(a).

Eu , RG , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) nascido(a) em ____/____/____ , seja voluntário do estudo “**DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE VÍRUS RESPIRÁTORIOS HUMANOS EM AMOSTRAS CLÍNICAS PELA TÉCNICA DE GENESCAN-RT-PCR.**” , esclareço que obtive todas informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que possam descobrir as possíveis causas da doença denominada “*Doenças Respiratórias*” (explicar o que significa os termos científicos).
- II) Serão feitas duas coletas de aspirado de nasofaringe do(a) meu(minha) filho(a);

- III) Essas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciará no tratamento de meu (minha) filho(a); não vai curá-lo (a); mas não causará nenhum problema;
- IV) A participação neste projeto não tem objetivo de se submeter a um tratamento terapêutico e será sem custo algum para mim;
- V) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), e sem que venha interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu filho sejam mencionados;
- VIII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa
- ☐ Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- ☐ Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Paulo, de de 2003

☐ Paciente / ☐ Responsável

.....

Testemunha 1 : _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____
Dr. **RESPONSÁVEL**

ANEXO 2: Diagnóstico obtido por IFI e por GeneScan em amostras colhidas em 2003.

R2003-	IFI+CC	HRSV	HMPV	Para3	Para+	InfluA	Adeno	Pic
1	Ad	—	—	—	—	—	—	—
2	HRSV	—	—	—	—	—	—	—
3	Neg	—	—	—	—	—	—	+
4	Neg	—	—	—	—	—	—	—
33	Neg	+	—	—	—	—	—	+
34	RSV-IA	+	—	—	—	—	—	+
35	Neg	—	—	—	—	—	—	+
36	Neg	+	—	—	—	—	—	+
48	Neg	—	—	—	—	—	—	—
49	HRSV	+	—	—	—	—	—	+
66	Neg	+	—	—	—	—	—	+
67	HRSV	—	—	—	—	—	—	+
68	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
81	Neg	+	—	—	—	—	—	+
82	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
83	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
84	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
85	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
86	Neg	—	+	—	—	—	—	—
87	HRSV	—	—	—	—	—	—	+
88	HRSV	+	—	—	—	—	—	+
89	Ad	—	+	—	—	—	—	—
90	HRSV	+	—	—	—	—	—	+
91	HRSV	+	—	—	—	—	—	+
92	HRSV	+	—	—	—	—	+	+
98	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
99	HRSV	+	—	—	—	—	+	—
100	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
101	Neg	—	+	—	—	—	—	+
102	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
103	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
104	HRSV	—	—	—	—	—	—	—
105	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
106	?	—	—	—	—	—	—	—
107	?	+	—	—	—	—	—	—
115	Neg	—	—	—	—	—	—	—
116	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
117	neg	—	—	—	—	—	—	+
118	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
119	neg	+	—	—	—	—	—	+
120	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
135	Neg	—	—	—	—	—	—	—
136	HRSV	+	—	—	—	—	—	+
137	HRSV	+	—	—	—	—	—	+
138	HRSV	+	—	—	—	—	—	+

R2003-	IFI+CC	HRSV	HMPV	Para3	Para+	InfluA	Adeno	Pic
139	Neg	+	+	—	—	—	—	+
140	HRSV	+	+	—	—	—	—	—
141	HRSV	+	+	—	—	—	—	—
142	Neg	+	—	—	—	—	—	—
143	Neg	—	—	—	—	—	—	+
144	Neg	—	—	—	—	—	—	+
145	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
146	Neg	—	—	—	—	—	—	+
147	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
148	HRSV	—	—	—	—	—	—	—
149	Neg	—	—	—	—	—	—	+
150	HRSV	—	—	—	—	—	—	+
151	HRSV	—	—	—	—	—	—	—
152	Neg	+	—	—	—	—	—	+
153	Neg	+	—	—	—	—	—	+
154	Neg	—	—	—	—	+	—	—
155	Neg	+	—	—	—	—	—	—
156	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
157	?	+	—	—	—	—	—	+
158	HRSV	+	—	—	—	—	—	+
159	Neg	+	—	—	—	—	—	+
160	Neg	—	—	—	—	—	—	+
161	Neg	+	—	—	—	—	—	+
162	Neg	—	—	—	—	—	—	—
163	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
164	Neg	—	—	—	—	—	—	+
165	Neg	+	—	—	—	—	—	+
166	?	+	—	—	—	—	—	—
167	Neg	—	—	—	—	—	—	—
168	Neg	—	—	—	—	—	—	—
169	Neg	—	—	—	—	—	—	+
170	Neg	—	—	—	—	—	—	+
171	Neg	—	—	—	—	—	—	—
172	Neg	—	—	—	—	—	—	—
173	HRSV	+	—	—	—	—	—	+
174	Neg	—	—	—	—	—	—	—
175	Neg	—	—	—	—	—	—	—
176	Neg	—	—	—	—	—	—	—
177	Neg	—	—	—	—	—	—	+
178	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
179	HRSV	—	—	—	—	—	—	—
180	Neg	—	—	—	—	—	—	+
181	Neg	—	—	—	—	—	—	—
182	Neg	—	—	—	—	—	—	—
183	HRSV	—	—	—	—	—	—	—
184	Neg	—	—	—	—	—	—	—

R2003-	IFI+CC	HRSV	HMPV	Para3	Para+	InfluA	Adeno	Pic
185	Neg	—	—	—	—	—	—	—
186	Neg	+	—	—	—	—	—	+
187	Neg	—	—	—	—	—	—	+
188	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
189	Neg	—	+	—	—	—	—	—
190	Neg	—	+	—	—	—	—	+
191	HRSV	+	+	—	—	—	—	—
192	Neg	+	—	—	—	—	—	—
193	Neg	—	—	—	—	—	—	+
194	Neg	—	—	—	—	+	—	—
195	Neg	—	+	—	—	+	—	—
196	Neg	+	—	—	—	—	—	+
197	HRSV	+	—	—	—	—	—	+
198	P3/rsv	+	—	+	—	—	—	—
199	Neg	—	—	—	—	+	—	—
200	HRSV	—	—	—	—	—	—	—
201	?	—	—	—	—	—	—	—
202	Neg	—	—	—	—	—	—	—
203	Neg	—	—	—	—	—	—	+
204	Neg	—	—	—	—	—	—	—
205	Neg	—	—	—	—	—	—	+
206	IA	—	—	—	—	+	—	—
207	Neg	+	—	—	—	+	—	+
208	Neg	—	+	—	—	—	—	—
209	Neg	—	—	—	—	—	—	—
210	Neg	—	—	—	—	—	—	+
211	Neg	—	—	—	—	+	—	—
212	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
213	Neg	—	—	—	—	+	—	—
214	Neg	—	—	—	—	—	—	—
215	Neg	—	—	—	—	—	—	+
216	Neg	—	—	—	—	+	—	—
217	Neg	—	+	+	—	—	—	—
218	Neg	—	—	—	—	+	—	+
219	Neg	—	—	—	—	—	—	+
220	Neg	+	+	—	—	—	—	+
221	Neg	—	+	—	—	—	—	+
222	Neg	—	—	—	—	—	—	+
223	Neg	+	—	—	—	—	—	—
224	Neg	—	—	—	—	—	—	+
225	Neg	—	—	+	—	—	—	+
226	Neg	—	—	—	—	—	—	+
227	Neg	—	—	—	—	—	—	—
228	Neg	—	—	—	—	—	—	—
229	Neg	+	—	—	—	—	—	—
230	Neg	—	—	—	—	—	—	—
231	Neg	—	—	—	—	—	—	—

R2003-	IFI+CC	HRSV	HMPV	Para3	Para+	InfluA	Adeno	Pic
232	HRSV	+	—	—	—	+	—	—
233	Neg	+	—	—	—	—	—	—
234	HRSV	+	—	—	—	—	—	+
235	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
236	Neg	—	—	—	—	+	—	—
237	Neg	—	—	—	—	—	—	+
238	Neg	—	—	—	—	—	—	+
239	Neg	—	—	—	—	—	—	+
240	Neg	+	—	—	—	—	—	—
241	Neg	+	—	—	—	—	—	—
242	Neg	—	—	—	—	—	—	—
243	Neg	—	—	—	—	—	—	—
244	Neg	—	—	—	—	—	—	+
245	Neg	—	—	—	—	—	—	+
246	Neg	—	—	—	—	—	—	—
247	Neg	+	—	—	—	—	—	—
248	Neg	+	—	—	—	—	—	+
249	?	—	+	—	—	—	—	+
250	Neg	—	—	—	—	—	—	—
251	Neg	—	—	—	—	—	—	—
252	Neg	—	—	—	—	—	—	—
253	Neg	—	—	—	—	+	—	—
254	Neg	—	—	—	—	—	—	—
255	Neg	—	—	—	—	—	—	—
256	Neg	—	—	—	—	—	—	—
257	HRSV	—	+	—	—	—	—	—
258	Neg	—	+	—	—	—	—	—
259	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
260	Neg	—	—	—	—	+	—	—
261	Neg	—	+	—	—	—	—	—
262	Neg	—	—	—	—	—	—	+
263	Neg	—	—	—	—	—	—	—
264	Neg	—	—	—	—	—	—	—
265	Neg	—	—	—	—	+	—	—
267	Neg	—	—	—	—	—	—	—
268	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
269	Neg	—	—	—	—	—	—	+
270	Neg	—	—	—	—	—	—	+
271	Neg	—	—	—	—	—	—	—
272	Neg	—	—	—	—	—	—	—
273	Neg	—	—	—	—	—	—	—
274	Neg	—	—	—	—	—	—	+
275	Neg	—	—	—	—	—	—	+
276	HRSV	—	—	—	—	—	—	+
277	Neg	—	—	—	—	—	—	+
278	Neg	—	—	—	—	—	—	—
279	Neg	—	—	—	—	—	—	—

R2003-	IFI+CC	HRSV	HMPV	Para3	Para+	InfluA	Adeno	Pic
280	Ad	—	—	—	—	—	—	+
281	Ad	—	—	—	—	—	—	+
282	Neg	—	—	—	—	—	—	—
283	Ad	—	—	—	—	—	+	+
284	HRSV	+	—	—	—	+	—	—
285	Neg	—	—	—	—	—	—	+
286	HRSV	+	—	—	—	—	—	+
287	Ad	—	—	—	—	—	—	+
288	Neg	—	—	—	—	—	—	+
289	Neg	—	—	+	—	—	—	—
290	Neg	—	—	—	—	—	—	+
291	HRSV	—	—	—	—	—	—	—
292	Neg	—	—	—	—	—	—	+
293	Neg	—	+	—	—	—	—	—
294	Neg	—	—	—	—	—	—	—
295	Neg	—	—	—	—	—	—	—
296	HRSV	+	—	—	+	—	—	+
297	Neg	—	—	—	—	—	—	—
298	Neg	—	+	—	—	—	—	+
299	HRSV	—	—	—	—	—	—	—
300	Neg	—	+	—	—	—	—	—
301	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
302	Neg	+	—	—	—	—	—	—
303	Neg	—	—	—	—	—	—	+
304	Neg	—	—	+	—	—	—	—
305	Neg	—	+	—	—	—	—	+
306	Neg	—	—	—	—	—	—	—
307	Neg	—	—	—	—	—	—	+
308	Neg	—	—	—	—	—	—	+
309	Neg	—	—	+	—	+	—	+
310	P3	—	—	—	—	—	—	+
311	HRSV	+	—	—	—	—	—	+
312	Neg	—	+	—	—	—	—	—
313	Neg	—	+	—	—	—	—	—
314	Neg	—	+	—	—	—	—	+
315	Neg	—	—	—	—	—	—	—
316	Neg	—	+	—	—	—	—	+
317	Neg	—	—	—	—	—	—	+
318	Neg	—	+	—	—	—	—	+
319	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
320	Neg	—	+	—	—	—	—	+
321	Neg	—	—	—	—	—	+	+
322	Neg	—	—	—	—	—	—	+
323	Neg	—	—	—	—	—	—	+
324	Neg	—	+	—	—	—	—	—
325	Neg	—	—	—	—	—	—	+
326	Neg	—	+	—	—	—	—	—

R2003-	IFI+CC	HRSV	HMPV	Para3	Para+	InfluA	Adeno	Pic
327	Neg	—	+	—	—	—	—	+
328	Ad	—	—	—	—	—	+	+
329	Ad	—	+	—	—	—	+	—
330	Ad	—	—	—	—	—	+	+
331	Neg	—	—	+	—	—	—	—
332	Neg	—	—	—	—	—	—	—
333	P3	—	—	+	—	—	—	—
334	Neg	—	—	—	—	—	—	+
335	Neg	—	—	—	—	—	—	—
336	P3	—	—	+	—	—	—	—
337	Neg	—	—	+	—	—	—	+
338	P3	—	—	+	—	—	—	+
339	Neg	—	—	+	—	—	—	+
340	Ad	—	—	+	—	—	+	+
341	Neg	—	—	+	—	—	—	—
342	P3	—	—	+	—	—	—	+
343	P3	—	—	+	—	—	—	+
344	Ad	—	—	+	—	—	+	+
345	P3	—	—	+	—	—	—	+
346	Ad	—	—	—	—	—	+	+
347	Ad	—	+	—	—	—	+	—
348	Neg	—	—	—	—	—	—	+
349	Neg	—	—	—	—	—	—	+
350	Ad	—	—	—	—	—	+	+
351	Neg	—	+	—	—	—	+	+
352	Ad	—	+	—	—	—	—	+
353	Neg	—	—	+	—	—	—	+
354	Neg	+	—	+	—	—	—	+
355	Neg	—	—	—	+	—	—	+
356	Neg	—	—	+	—	—	—	—
357	Neg	—	—	—	—	—	—	+
358	Neg	—	+	—	—	—	—	+
359	Neg	—	+	—	—	—	—	—
360	Neg	—	—	—	—	—	—	—
361	Neg	—	—	—	—	—	—	+
362	Ad	—	—	—	—	—	+	—
363	Neg	—	—	—	—	—	—	+
364	Ad	—	—	—	—	—	+	—
365	Neg	—	—	—	—	—	—	—
366	Neg	—	—	—	—	—	—	—
367	Neg	—	+	—	—	—	—	—
368	Neg	—	+	—	—	—	—	—
369	Neg	—	+	—	—	—	—	—
370	Neg	—	—	—	—	—	—	+
371	Neg	—	—	+	—	—	—	—
372	Ad	—	+	—	—	—	+	+
373	Ad	—	—	—	—	—	+	+

R2003-	IFI+CC	HRSV	HMPV	Para3	Para+	InfluA	Adeno	Pic
374	Neg	—	—	—	—	—	—	+
375	Ad	—	—	—	—	—	+	+
376	Neg	—	+	—	—	—	—	—
377	Neg	—	+	—	—	—	—	—
378	Neg	—	+	—	—	—	—	—
379	Neg	—	—	—	—	—	—	+
380	Neg	—	—	—	—	—	—	—
381	Neg	—	—	—	—	—	—	—
382	Neg	—	+	—	—	—	—	—
383	Neg	—	—	—	—	—	—	+
384	Neg	—	—	—	—	—	+	—
385	Neg	—	+	—	—	—	—	—
386	Neg	—	+	—	—	—	—	—
387	Neg	—	—	—	—	—	—	+
388	Neg	—	—	+	—	—	+	—
389	Neg	—	+	—	—	—	—	—
390	Ad	—	—	—	—	—	+	—
391	Neg	—	—	—	—	—	+	—
392	Neg	—	—	+	—	—	—	—
393	Neg	—	+	—	—	—	—	—
394	Neg	—	—	—	—	—	—	+
395	Neg	—	+	—	—	—	—	+
396	Neg	—	—	—	—	—	—	—
397	Neg	—	+	—	—	—	—	—
398	Ad	—	—	—	—	—	—	+
399	Neg	—	+	—	—	—	—	—
400	Neg	—	+	—	—	—	—	—
401	Neg	—	+	—	—	—	—	—
402	Ad	—	—	+	—	—	+	—
403	Neg	—	—	—	—	—	—	+
404	Neg	—	+	—	—	—	—	+
405	Neg	—	—	—	—	—	—	+
406	Neg	—	—	+	—	—	—	—
407	P3	—	—	+	—	—	—	+
408	Neg	—	+	—	—	—	—	—
409	Neg	+	—	—	—	—	—	+
410	Neg	—	—	—	—	—	—	—
411	Neg	—	—	—	—	—	—	+
412	Neg	—	—	—	—	—	—	+
413	HRSV	+	—	—	—	—	—	—
414	Neg	—	+	—	—	—	—	+
415	Neg	—	—	—	—	—	—	—
416	Neg	—	—	—	—	—	—	—
417	Neg	—	—	—	—	—	—	—

R2003-	IFI+CC	HRSV	HMPV	Para3	Para+	Influa	Adeno	Pic
418	Neg	—	—	—	—	—	—	+
419	Neg	—	+	—	—	—	—	+
420	Neg		+	—	—	—	—	—
421	Neg	—	—	—	—	—	—	+
422	Neg	—	—	—	—	—	—	—
423	Neg	+	—	—	—	—	—	+
424	Neg	—	—	+	—	—	—	—
425	Neg	—	+	—	—	—	—	+
426	Neg	—	—	—	—	—	—	+
427	Neg	—	—	—	—	—	—	—
428	Neg	—	—	—	—	—	—	+
429	Neg	—	—	—	—	—	—	—
430	Neg	—	—	—	—	—	—	+

ANEXO 3: Extração de DNA adenoviral por SHINAGAWA*

- 1) Adicionar 750 µL de Trizol à 250µL da amostra (usar tubos de 2 ml)
- 2) Adicionar 200µL de clorofórmio, vortexar e incubar 5' à TA
- 3) Centrifugar 12000 rpm por 15 min à 4°C
- 4) Separar o sobrenadante (RNA), guardando em outros tubos para eventual posterior extração do RNA
- 5) Acrescentar 750µL de etanol absoluto gelado (-20°C) e misturar gentilmente umas 5x
- 6) Incubar a -20°C por 1h
- 7) Centrifugar 12000 rpm por 15 min à 4°C
- 8) Manter no gelo e descartar o sobrenadante todo, emborcando o tubo no papel
- 9) Acrescentar 500µL de TE 1x, 10µL de NaCl 5M, 25µL de SDS 10% e misturar delicadamente por inversão
- 10) Acrescentar 5µL de proteinase K (10 mg/mL) e incubar 60°C por 1 hora
- 11) Adicionar 500µL de fenol clorofórmio (pegar a fase de baixo). Vortexar e centrifugar a 12000 rpm, 10 min à 4°C
- 12) Recolher o sobrenadante (fase aquosa) e transferir para um tubo novo
- 13) Adicionar igual volume (500µL) de éter etílico saturado (pegar a fase de cima)
- 14) Centrifugar 12000 rpm por 5 min à 4°C
- 15) Descartar a fase superior com pipeta (éter)
- 16) Deixar as amostras no banho seco (60°C) por 5 min para evaporação total do éter
- 17) Adicionar 500µL de isopropanol, misturar bem e incubar por 1h à -70°C, ou over-night à -20°C
- 18) Centrifugar 13000 rpm, 10 min à 4°C. Manter os tubos no gelo
- 19) Descartar todo o sobrenadante emborcando os tubos e secando com papel filtro
- 20) Ressuspender o pellet em 50µL de TE ou água Ultrapure.

* Retirado de A Rapid and Simple Method for Preparation of Adenovirus DNA from Infected Cells. SHINAGAWA, M.; MATSUDA, A.; ISHIYAMA, T.; GOTO, H.; SATO, G. Microbiol. Immunol.; 27(9): 817-822, 1983.