ADRIANA FREIRE MACHADO

**Caracterização molecular das cepas do Vírus Sincicial
Respiratório identificadas nos anos de 2001 e 2002 em
unidade de transplante de células-tronco hematopoéticas**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Área de concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias**

Orientadora: Dra. Clarisse Martins Machado

**São Paulo
2007**

Aos meus pais, Emersom e Arlene, que sempre investiram em mim, e acreditaram que um dia eu iria colher frutos do meu estudo.

Às minhas irmãs, Elisa e Arlete, minhas companheiras, que sempre vibram com a vitória da outra, como se fosse a própria vitória.

Ao caçulinha da família, meu sobrinho Kaíque, que há pouco tempo chegou na família e já é o responsável pela nossa constante alegria.

Agradecimentos

À Dra. Clarisse Martins Machado, minha orientadora, pesquisadora dedicada e sempre com sua visão à frente pela oportunidade, confiança, pelos ensinamentos.

Ao Prof^o Dr. Cláudio Sérgio Pannuti, pela oportunidade, pelo exemplo de integridade e dedicação.

À Prof^a Dra. Maria Anice Sallum, pelas palavras de incentivo, pela disponibilidade, pelo auxílio e ensinamentos nas análises filogenéticas.

À Lucy Vilas Boas, minha grande amiga, por ter-me “adotado” ainda como estudante de iniciação científica, pelos seus conselhos maduros, pelo processamento de algumas amostras deste trabalho.

À Alexandra Dias Reis, por ter me introduzido no “mundo do RSV” emprestando seu conhecimento e seus reagentes, pelas dicas, pela amizade, pelos bate-papos.

À Adriana Fumie Tateno pela sua constante disponibilidade, pela ajuda na execução das reações de seqüências, pelas suas valiosas dicas.

À Dra. Viviane F. Botosso por ter cedido as seqüências das cepas do RSV dos pacientes do Hospital Universitário da USP e pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

À Daniele Bruna Leah e Prof^o Dr. Edison L. Durigon por ter cedido as seqüências das cepas do RSV dos pacientes do Hospital Universitário da USP e pela constante disponibilidade e oferta de ajuda.

Às Dras. Sílvia F. Costa e Daisy M. Machado pelas dicas e valiosas sugestões feitas no exame de qualificação.

Ao Bruno Gianfratti, meu companheiro, amigo, que sempre me apoiou, me incentivou e vibra com minhas vitórias.

À Daniela S. de Angelis, ao José de Paula Paz Jr e ao Renato dos Reis Oliveira pelos cinco anos de amizade, pelo convívio agradável, pelas dicas, pelo companheirismo nos momentos de aflição.

Ao Dr. José Eduardo Levi, pelo ensinamento em biologia molecular e pela oportunidade de sempre aprender mais.

À Dra. Vanda Ueda, exemplo de pesquisadora, que todo dia me ensina o que é o amor em fazer pesquisa.

A toda equipe do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP ou pelos amigos que por lá já passaram, pela troca constante de aprendizado, pelas conversas, pelos conselhos, pelos momentos de euforias nas festas do laboratório: Alessandra, Dr. Aluísio, Amanda, Ana Carolina, Anderson, Carla, Célia, Cícero, Cynthia, Daniel, Débora, Eduardo, Elaine, Érica, Eveline, Jaila, Jennifer, Jussara, Laura, Luciano, Luiz Vicente, Maria, Maria Carolina, Maria Cristina, Marli, Michela, Shinai, Sílvia, Synara, Sônia, Rodrigo Merlim, Rodrigo Vela, Tânia, Vera, Viviane, Wilton.

Ao meu tio Luiz Carlos por sempre incentivar os meus estudos e me apoiar.

Às minhas queridas amigas do Mackenzie Marina e Michelle que me acompanharam desde o início do mestrado dando-me conselhos, dicas e trocando idéias.

Aos pacientes, cujas amostras foram usadas neste estudo, que mesmo com todo sofrimento causado pela doença assinaram o termo de consentimento aceitando participar do estudo.

À CAPES e ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher (Cora Coralina)”.*

SUMÁRIO

Resumo	
Summary	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	
<i>1. Introdução</i>	1
1.1 Histórico	2
1.2 Classificação	3
1.3 Estrutura viral	4
1.4 Replicação Viral	10
1.5 Variação Antigênica	12
1.5.1 Variabilidade genotípica	14
1.6 Diagnóstico laboratorial	18
1.7 Epidemiologia	21
1.8 Imunopatogênese	23
1.9 RSV em receptores de transplante de células-tronco hematopoéticas	26
1.9.1 Prevenção e tratamento	30
1.9.2 Infecção nosocomial	32
<i>Justificativa</i>	35
<i>2. Objetivo</i>	36
<i>3. Casuística e Métodos</i>	38
3.1 População estudada	39
3.2 Características das unidades de internação e ambulatório de TCTH	39
3.3 Definições	40
3.3.1 Infecção em serviços de saúde	40
3.3.2 Período de diagnóstico positivo para o RSV	41
3.3.3 Infecção no trato respiratório superior e trato inferior	41
3.4 Medidas de controle de infecção por vírus respiratórios	41
3.5 Conduta mediante infecção pelo RSV	42
3.6 Métodos laboratoriais e de análise	43
3.7 Análise dos dados e construção das topologias	51
3.8 Aspectos éticos	53
<i>4. Resultados</i>	54
<i>5. Discussão</i>	69
<i>6. Conclusões</i>	82
<i>7. Anexos</i>	84
<i>8. Referências bibliográficas</i>	91
<i>9. Apêndice</i>	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxonomia do Vírus Sincicial Respiratório Humano e de outros vírus relacionados.. ..	4
Figura 2 - Desenho esquemático da proteína G	9
Figura 3 - Genoma do RSV e um diagrama esquemático da partícula viral	12
Figura 4 - Fluxograma dos métodos laboratoriais deste trabalho.....	44
Figura 5 - Foto de gel de agarose do produto do RSV amplificado por “ <i>semi nested RT-PCR</i> ”	57
Figura 6 – Árvore filogenética pelo método de verossimilhança para amostras do grupo A junto às cepas circulantes na comunidade	63
Figura 7 – Árvore filogenética pelo método de verossimilhança para amostras do grupo B junto às cepas circulantes na comunidade	64
Figura 8 - Árvore filogenética pelo método de distância utilizando o algoritmo neighbour-joining das amostras do RSV do grupo A junto às seqüências extraídas do Genbank para realização da genotipagem.....	65
Figura 9 - Árvore filogenética pelo método de distância utilizando o algoritmo neighbour-joining das amostras do RSV do grupo B junto às seqüências extraídas do Genbank para realização da genotipagem.....	66
Figura 10 - Mapa da infecção RSV dentro da unidade de TCTH no HC nos anos de 2001 e 2002.....	67
Figura 11 - Mapa amplificado da infecção RSV dos pacientes que tiveram cepas altamente relacionadas dentro da unidade de TCTH no HC nos anos de 2001 e 2002	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüência dos iniciadores utilizados nas reações de PCR.....	48
Tabela 2 - Características dos pacientes infectados pelo RSV no ano de 2001	56
Tabela 3 - Características dos pacientes infectados pelo RSV no ano de 2002.....	56
Tabela 4 - Grupo e genótipo do RSV dos pacientes infectados em 2001	58
Tabela 5 - Grupo e genótipo do RSV dos pacientes infectados em 2002.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A-terminal: amino terminal
C-terminal: carboxi terminal
cDNA: DNA complementar
col.: colaboradores
DEPEC: Dietilpirocarbonato
DNA: Ácido desoxiribonucleico
DNTP: Desoxinucleotídeos trifosfatos
DRTI: Doença respiratória no trato inferior
DTT: Ditioneitol
EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético
FMUSP: Faculdade de Medicina da USP
HC: Hospital das Clínicas
IFD: Imunofluorescência direta
IgA: Imunoglobulina A
IgE: Imunoglobulina E
IgG: Imunoglobulina G
IgM: Imunoglobulina M
IL: Interleucina
l: Litro
LNF: Lavado de nasofaringe
M: Molar
m: Mili (10^{-3})
 μ : Micro (10^{-6})
NK: do inglês "*natural killer*"
Pb: Pares de base
PCR: Reação em cadeia polimerase
pmoles: Picomoles (10^{-12} moles)
proteína F: proteína de fusão
Proteína G: proteína de adesão
qsp: Quantidade suficiente para
RNA: Ácido ribonucleico
RNasin: inibidor de ribonuclease
RT: Transcriptase reversa
RSV: Vírus Sincicial respiratório (do inglês "*Respiratory Syncytial Virus*")
TAE: Tampão tris acetato EDTA
TCTH: Transplante de células-tronco hematopoiéticas
USP: Universidade de São Paulo

Machado AF. Caracterização molecular das cepas do Vírus Sincicial Respiratório identificadas nos anos de 2001 e 2002 em unidade de transplante de células-tronco hematopoéticas (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório (RSV) é reconhecido como agente causador de infecção nosocomial entre receptores de pacientes de células-tronco hematopoéticas causando morbidade e mortalidade consideráveis nesses pacientes. O objetivo desse estudo foi caracterizar as cepas do RSV isoladas de receptores de transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo durante sua estadiação. As cepas do RSV foram tipadas (em grupo A ou B) e genotipadas. Das sete cepas analisadas dos receptores de TCTH durante o ano de 2001, somente duas pertenciam ao grupo B, as outras cinco eram pertencentes ao grupo A. Dessas sete cepas, três eram altamente relacionadas e haviam infectados pacientes que freqüentavam o ambulatório. Em 2002, das doze cepas analisadas, três pertenciam ao grupo A e as outras nove pertenciam ao grupo B. Sete cepas eram altamente relacionadas entre elas e eram também de pacientes de ambulatório sugerindo que a transmissão em hospital-dia era mais provável. Enfim, múltiplos genótipos do RSV co-circularam nas unidades de TCTH (ambulatório e enfermaria) do Hospital das Clínicas entre 2001 e 2002. A transmissão nosocomial foi mais provável ocorrer no ambulatório da unidade de TCTH quando comparada à enfermaria. Políticas de controle de infecção devem ser também implementadas em ambulatórios para evitar transmissão nosocomial do RSV e outros vírus respiratórios em pacientes de ambulatório.

Descritores: 1.Infecções por respiratório sincicial/transmissão 2.Transplante de medula óssea. 3.Epidemiologia molecular 4.Infecção hospitalar 5.Hospedeiro imunocomprometido 6.Células-tronco hematopoéticas

Machado AF. Molecular characterization of strains of Respiratory Syncytial Virus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Unit identified in 2001 and 2002 (dissertation). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

SUMMARY

Respiratory Syncytial Virus is recognized as the leading cause of nosocomial respiratory infection among recipients of hematopoietic stem cell transplant (HSCT) causing considerable morbidity and mortality among these patients. The aim of this study was to characterize the strains of Respiratory Syncytial Virus in recipients of Hematopoietic Stem Cell Transplant Unit (HSCT) at Hospital das Clínicas, University of São Paulo Medical School during RSV season in symptomatic HSCT recipients at Hospital das Clínicas. The strains of RSV were typed (in group A or B) and genotyped. Of the seven strains analyzed from HSCT recipients during 2001, only two belonged to group B, the other five belonged to group A. Of these seven strains, three were closely related and were from outpatients. In 2002, of the twelve strains analyzed, three belonged to group A and the other nine belonged to group B. Seven strains were closely related and were also from outpatients suggesting that nosocomial transmission in hospital-day was more likely. In conclusion, multiple genotypes of RSV co-circulated in the Hematopoietic Stem Cell Transplant units (ward and day-hospital) of Hospital das Clínicas between 2001 and 2002. Nosocomial transmission was more likely to occur at the HSCT Day-hospital as compared to the HSCT ward. Infection control practices should be also implemented at Day-hospital Units to avoid nosocomial transmission of RSV and other respiratory viruses in outpatient units.

Descriptors: 1. Respiratory syncytial virus/transmission 2. Bone marrow transplantation 3. Molecular epidemiology 4. Cross infection 5. Immunocompromised host 6. Hematopoietic stem cells.

I INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O primeiro relato do Vírus Sincicial Respiratório foi feito em 1956 por Morris e col. Eles relataram doença respiratória ocorrida em 1955, caracterizada por coriza, espirros, tosse, secreção mucopurulenta em uma colônia de vinte chimpanzés no Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) Washington, D.C. (Morris *et al.*, 1956).

A secreção colhida da garganta de um chimpanzé doente foi inoculada em cultura de células hepáticas e essas degeneraram-se e morreram após sete dias da inoculação. O vírus foi inicialmente chamado de agente de coriza de chimpanzé (*chimpanzee coriza agent* - CCA). Posteriormente, o material isolado foi inoculado em outros mamíferos (camundongos, coelhos, cobaias) e ovos embrionados e não foram notados sinais de doença (Morris *et al.*, 1956).

Chanock *et al.* (1957) isolaram um vírus similar ao CCA de uma criança com pneumonia e outra criança com crupe em Baltimore. Devido à capacidade de formar sincícios em cultura de células e sua afinidade pelo trato respiratório, o nome *chimpanzee coriza agent* foi substituído por *Vírus Sincicial Respiratório* (*Respiratory Syncytial Vírus* - RSV) (Chanock *et al.*, 1957).

Em Baltimore, estudos sorológicos foram realizados avaliando a infecção pelo RSV e verificou-se que a maioria das crianças com menos de quatro anos de idade já tinham se infectado pelo vírus (Chanock *et al.*, 1957). Outros estudos em vários lugares do mundo mostraram que o RSV estava

associado à doença do trato respiratório inferior durante a infância (Collins *et al.*, 2001).

No Brasil, em 1964, Candeias isolou o RSV de amostras respiratórias de quatro crianças com menos de seis meses de idade com quadro de broncopneumonia e bronquiolite internadas em um hospital infantil na cidade de São Paulo. A confirmação do isolamento foi realizada utilizando-se o teste de neutralização com o soro padrão (Candeias, 1967).

1.2. Classificação

O Vírus Sincicial Respiratório Humano é pertencente ao gênero *Pneumovirus*, gênero a qual pertence também o Vírus Sincicial Respiratório Bovino e o Vírus da Pneumonia de Camundongos; à subfamília *Pneumovirinae* junto ao Metapneumovirus Humano, recentemente descoberto; à família *Paramyxoviridae* e à ordem *Mononegavirales* (figura 1) (van den Hoogen *et al.*, 2001; The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2002; The NCBI Taxonomy Homepage, 2006).

Figura 1- Taxonomia do Vírus Sincicial Respiratório Humano e de outros vírus relacionados (The Universal Virus database of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2002; The NCBI Taxonomy Homepage, 2006).

1.3 Estrutura Viral

O vírion RSV consiste de um envelope de duas camadas lipídicas cobrindo o nucleocapsídeo de simetria helicoidal. Os vírions apresentam formas esféricas ou pleomórficas, sua medida é de 150 a 300 nm de diâmetro (Falsey & Walsh, 2000).

O genoma do RSV é RNA de fita simples, negativa, não segmentado, composto de aproximadamente 15.222 nucleotídeos e 10 genes que codificam 11 proteínas: NS1, NS2 (não estruturais), nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M), pequena proteína hidrofóbica (SH), proteína de adsorção (G), proteína de fusão (F), proteínas da matriz (M2-1, M2-2) e complexo polimerase (L) (figura 3) (Falsey & Walsh, 2000;).

O vírion RNA envolto pelas proteínas N, P e L (que constituem a replicase viral) formam o nucleocapsídeo. A dupla camada lipídica é obtida da membrana da célula hospedeira na qual estão as três glicoproteínas transmembranas (G, F e SH) (figura 3) (Falsey & Walsh, 2000).

A função das proteínas NS1 e NS2 não é completamente conhecida. Entretanto, o fato de serem não estruturais sugere que estejam relacionadas com a regulação da transcrição e da replicação do ácido nucléico viral. Há evidência que a proteína NS1 é um potente inibidor da transcrição intracelular e da replicação do RNA viral. Devido aos genes estarem localizados próximos à região promotora da transcrição, esses genes são os mais transcritos pelo vírus (Collins & Wertz, 1983; Atreya *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2001).

A proteína M (*matrix*) não é glicosilada e encontra-se na matriz. Acredita-se que nos Pneumovirus, assim como em outros vírus RNA não segmentados com polaridade negativa, a função dessa proteína é tornar o nucleocapsídeo transcripcionalmente inativo antes do seu empacotamento e mediar a associação do nucleocapsídeo com o envelope nascente (Collins *et al.*, 2001).

As proteínas M2 são restritas ao gênero *Pneumovirus*. Diferentemente de outros genes do RSV, cada unidade transcripcional do gene M2 codifica duas proteínas a M2-1 e a M2-2. (Collins *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 2005).

A proteína M2-1 é interna e não glicosilada e atua como um importante fator para transcrição na polimerase, principalmente para genes longos. Sua

ação é como um fator de alongação permitindo a completa síntese dos mRNAs (Collins *et al.*, 1996; Mason *et al.*, 2003).

A proteína M2-2 também é interna e não glicosilada. Atua com função regulatória, está envolvida na mudança da transcrição para a replicação do RNA viral durante o ciclo replicativo do vírus. Acredita-se que o fato de sua “*open reading frame*” ser sobreposta à do M2-1 ocorre um fino ajuste na expressão da M2-2 durante a replicação do RSV (Cheng *et al.*, 2005).

A proteína L (*large protein*) é a maior proteína expressa pelo vírus. Provavelmente, a proteína L é a enzima RNA polimerase RNA dependente, baseado em seu tamanho e localização no nucleocapsídeo. Contém seis segmentos altamente conservados e presume-se que apresentam domínios funcionais (Collins *et al.*, 2001).

A proteína P (*phosphoprotein*) é altamente fosforilada e, provavelmente, apresenta-se como um fator de tradução e replicação, como em outros vírus RNA não segmentados e de polaridade negativa (Collins *et al.*, 2001).

A proteína N (*nucleoprotein*) é a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo. Ela está associada ao RNA genômico e relaciona-se com a regulação da transcrição e da replicação do ácido nucléico viral (Collins *et al.*, 2001).

A proteína F apresenta duas subunidades após a glicosilação: a F1 e F2. A subunidade F1, relativamente bem conservada, fica ancorada à membrana. Essa proteína é responsável pela ligação do envelope viral à

membrana da célula hospedeira e posterior liberação do nucleocapsídeo ao citoplasma celular. As espículas da proteína F apresentam-se de forma homotetramérica, ou seja, cada espícula é formada por quatro unidades idênticas da proteína e induz à formação de anticorpos neutralizantes (Sullender *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2001).

A proteína SH (*small hydrofobic protein*) ainda não apresenta uma função bem estabelecida. Entretanto, pelo fato de ser uma proteína transmembrana, acredita-se que esteja envolvida com processos de adsorção, penetração e desnudamento do vírus. Embora, haja estudos que a proteína SH seja dispensável para replicação do vírus em cultura de tecido (Collins *et al.*, 2001; McDonald *et al.*, 2006).

A proteína G apresenta maior variabilidade entre as proteínas do RSV. Diversos estudos de epidemiologia molecular e imunologia são enfocados nessa proteína (Cane, 2001). A maior ênfase na explicação aqui da glicoproteína G é necessária para maior compreensão da metodologia e desenvolvimento do trabalho.

Todas as proteínas exceto NS1, NS2 e M2-2 são componentes dos vírions. As proteínas G e F são alvos da resposta humoral. As proteínas N, F, M2-1 e SH são alvos de células T citotóxicas (Wertz & Moudy, 2004).

1.3.1 A glicoproteína G

O gene da glicoproteína G é o mais variável entre os diferentes genótipos do RSV. Essa proteína é um tipo II de glicoproteína, ou seja, está ancorada à membrana próxima à porção amino-terminal por um domínio

hidrofóbico, não clivável do tipo sinal-âncora. O sinal-âncora é uma região responsável pela ancoragem da proteína ao envelope viral. A proteína G apresenta de 289 a 299 aminoácidos dependendo da cepa do vírus, é altamente glicosilada com nitrogênio e oxigênio ligados a açúcares e é rica em resíduos de serina, prolina e treonina, características peculiares aos Pneumovirus (Cane *et al.*, 1991).

Recentemente, estudos observaram a inserção de sessenta nucleotídeos no gene da proteína G, fato que confere um aumento de vinte aminoácidos na cadeia peptídica da proteína G. A polimerase do RSV copia repetidamente parte da sequência do gene da proteína G, como um mecanismo adicional gerando maior diversidade no vírus. Provavelmente, essa inserção confere um aumento da glicosilação na proteína o que pode determinar um aumento da antigenicidade e infectividade do vírus. (Trento *et al.*, 2006; Nagai *et al.*, 2004).

O ectodomínio da proteína G tem uma região central bastante conservada, apresentando quatro resíduos de cisteína que são altamente conservados, flanqueados por duas regiões quem mostram um alto nível de variação na sequência (figura 2). A região central conservada é levemente hidrofóbica e propõe-se como um suposto sítio de ligação (Jhonson *et al.*, 1987).

Outra forma da proteína é produzida em abundância nas células infectadas. Essa é uma versão solúvel que é desprovida da região citoplasmática e transmembrana e é gerada pela iniciação num triploto alternativo AUG localizado no domínio hidrofóbico seguido por remoção

proteolítica do domínio sinal/âncora. A função biológica dessa forma protéica ainda é desconhecida, porém parece relacionar-se com a imunopatologia das infecções (Hendricks *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1994).

Como apresenta alta variabilidade, a glicoproteína G possui um dos mais altos graus de tolerância para mudança de aminoácidos entre as proteínas estruturais dos vírus RNA. A diversidade genética do RSV é fortemente associada com as mudanças da glicoproteína G. Esse modo de evolução, que lembra o padrão de evolução do vírus Influenza B, é provavelmente determinado por muitos fatores, incluindo a disseminação de um lugar para o outro e o surgimento de novas variantes através da seleção imune. Entretanto, as mudanças nessa proteína fornecem somente um grau de heterogeneidade moderado, visto que ainda não existem estudos consistentes mostrando a diversidade epidemiológica do RSV associada a diferentes morbidades (Johnson *et al.*, 1987; García *et al.*, 1994; Cintra *et al.*, 2001).

Figura 2- Desenho esquemático da proteína G. As áreas rachuradas correspondem a domínios citoplasmático e transmembrana respectivamente, e a área sem rachuras à região extracelular. As duas regiões em verde correspondem à regiões hipervariáveis e a região em verde mais claro corresponde à área mais conversada. Os “C” indicados correspondem a resíduos de cisteína. Extraído de Cane, 2001

1.4 Replicação Viral

O ciclo replicativo do RSV obedece ao padrão do ciclo dos outros paramixovirus, entretanto, é importante delinear vários aspectos da sua patogênese, incluindo a sua entrada na célula hospedeira pelas proteínas de superfície (as proteínas F e G), o que as difere dos outros paramixovirus (Srinivasakumar *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 2001).

Primeiramente, há ligação do vírus pela proteína de adsorção (proteína G) à superfície da célula hospedeira. O receptor específico para a glicoproteína G é a heparina ou outro glicosaminoglicano (GAs) presentes na membrana celular (Martinez & Melero, 2000). A seguir, ocorre a fusão do vírus e membrana celular por ação da proteína de fusão (proteína F) (Walsh & Hruska, 1983; Levine *et al.*, 1987). O nucleocapsídeo viral é liberado no citoplasma celular e todas as etapas da replicação do RSV ocorrerão no citoplasma celular, não ocorrendo envolvimento do núcleo celular (Kingsbury, 1990).

A proteína F também media a fusão de células infectadas com as células adjacentes que ainda não foram infectadas induzindo a formação de sincícios. As proteínas G e F são duas principais glicoproteínas de superfície encontradas na superfície das células infectadas. A pequena proteína hidrofóbica (proteína SH) codificada pelo RSV, também é expressa em altos níveis na superfície de células infectadas, porém é incorporada de forma ineficaz na partícula viral (Collins & Mottet, 1992).

Após a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma celular, ocorre, então, a transcrição do genoma viral, do sentido 3' a 5', a partir de um

promotor localizado na terminação 3'. A enzima RNA polimerase RNA dependente adere-se à região “*leader*” do genoma iniciando a transcrição do primeiro nucleotídeo. Na junção entre a região *leader* e o primeiro gene (NS1), ocorre a liberação do transcrito e a polimerase recomeça a transcrição de forma seqüencial do início ao fim, guiada pelos sinais de início e final do gene, região “*trailer*”. Esse mecanismo resulta na produção de RNAs mensageiros (mRNA) de cópias iguais ao gene original sem modificações. Os RNAs são poliadenilados na extremidade 3' e recebem um “*cap*” (nucleotídeo guanosina conectado ao RNA pela ligação 5' a 5' trifosfato) na extremidade 5' (Collins *et al.*, 2001).

Adicionalmente à transcrição e à tradução de proteínas, ocorre a replicação do genoma viral que produz uma fita de RNA intermediária positiva (+ssRNA), esta servirá como molde para gerar cópias do genoma viral (-ssRNA). A produção do intermediário positivo requer que a maquinaria de produção de mRNAs entre em um modo “anti-terminação”, ignorando todos os sinais de início e fim de cada gene, bem como a seqüência “*leader*” e NS1 (Collins *et al.*, 2001).

A princípio, a maturação do vírus ocorre com a combinação das proteínas N e P ao RNA genômico e subsequente adição de outras proteínas auxiliares ao nucleocapsídeo. As glicoproteínas virais, modificadas por glicosilação durante o transporte pelo retículo endoplasmático e pelo complexo de Golgi, ocupam o lugar das proteínas celulares na membrana citoplasmática. A seguir, a proteína da matriz se junta na porção interna do envelope nascente. O nucleocapsídeo alcança a superfície e ocorre seu

brotamento levando consigo uma porção da membrana plasmática (Kingsbury, 1990).

Figura 3- Genoma do RSV e um diagrama esquemático da partícula viral- Le-
"leader" e tr- "trailer" (Wertz & Moudy, 2004).

1.5 Variação Antigênica

Pioneiramente, Coates e col., em 1966, publicaram um trabalho que mostrava a variabilidade antígenoica de isolados de RSV pelo teste de neutralização com soro hiperimune. Os pesquisadores demonstraram as diferenças entre as cepas protótipo de laboratório A2 e 18537 por anti-soro policlonal (Coates *et al.*, 1966).

Posteriormente, com o advento de anticorpos monoclonais, um amplo número desses anticorpos de camundongos foi utilizado contra as proteínas N, P, M, F e G do Vírus Sincicial Respiratório. Observou-se que a glicoproteína G apresentava maior divergência em relação às outras proteínas. Foram então estabelecidos os dois grupos antígenoicos do RSV: grupo A e grupo B (Anderson *et al.*, 1985; Mufson *et al.*, 1985; García-Barreno

et al., 1989). Em 1991, Cristina e col. correlacionaram os dois grupos antigênicos a grupos distintos geneticamente (Cristina *et al.*, 1991).

Com base em testes de reatividade de anticorpos monoclonais com um amplo painel de cepas virais foram identificados três tipos de epítomos na glicoproteína G: a) epítomos conservados que estavam presentes em todos os isolados virais tanto do grupo A como do grupo B; b) epítomos grupos-específicos divididos por todos os vírus do grupo antigênico e c) epítomos cepa-específica ou epítomos variáveis que estão presentes em certos isolados do mesmo grupo antigênico (Martinez *et al.*, 1997).

Através da análise de nucleotídeos da proteína G de diversos isolados, verificou-se que para cada grupo do vírus (A e B) e dentro de cada subgrupo, a proteína G mostra uma alta divergência (Garcia *et al.*, 1994). Essa é de 33% de diferença na sequência de nucleotídeos e 47% na sequência de aminoácidos, entre os subgrupos A e B (Johnson *et al.*, 1987).

Embora, apresentem padrões evolutivos semelhantes, o grupo A do RSV apresenta uma maior variação que a do grupo B. Tal fato explica a predominância do grupo A em relação ao grupo B em diversos estudos epidemiológicos (Coggins *et al.*, 1998; Martinez *et al.*; 1999).

De acordo com Garcia, baseado na distribuição geográfica de amostras do grupo A e sua prevalência em diferentes epidemias, é provável que o vírus dissemina-se de um lugar a outro. Contudo, é importante ressaltar a rapidez com que o vírus originário de um lugar move-se a lugares distantes e a mudança genética viral devido à acumulação de mutações (García *et al.*, 1994).

1.5.1 Variabilidade genotípica

A variabilidade de isolados dentro dos grupos A e B do RSV foram inicialmente demonstradas com diferença nas reações com anticorpos monoclonais e depois usando métodos de clivagem com enzimas de restrição, ensaio com RNase, ensaio de mobilidade heteroduplex e análise de seqüenciamento de nucleotídeos (Sullender *et al.*, 1993; Cane, 2001; Kuroiwa *et al.*, 2004). O seqüenciamento de nucleotídeos do gene G mostra que a variabilidade de aminoácidos é acima de 20% dentro do grupo A e 9% dentro do grupo B (Cane, 2001).

Análises filogenéticas de seqüência de nucleotídeos do gene G permitiram a definição de um número de genótipos (caracterização da análise de nucleotídeos) do RSV pertencendo aos grupos A e B (Cane, 2001). As designações de genótipo são muito úteis na ilustração da multiplicidade de cepas circulando em um local, bem como a presença de genótipos predominantes durante a estação de RSV, a mudança na proporção relativa de cepas dos grupos A e B e na predominância de um genótipo a cada ano. Enfim, a diferença nas cepas ajuda a entender a transmissão do RSV em hospitais, na comunidade e globalmente (Peret *et al.*, 1998).

A nomenclatura dos genótipos não é ainda consistente entre laboratórios, está claro que novos genótipos costumam surgir, enquanto outros não são amplamente detectáveis (Cane, 2001; Venter *et al.*, 2001).

Peret e col., em 1998, mostraram em seu estudo que a ocorrência das mudanças nas cepas de RSV é consistente e uma importante característica da epidemiologia das infecções pelo RSV (Peret *et al.*, 1998). Inúmeros

trabalhos, em diversos países do mundo: África do Sul, Brasil, Estados Unidos, Quênia, demonstraram que múltiplos genótipos co-circulam em uma epidemia, genótipos diferentes predominam em cada epidemia e cepas detectadas no final da estação tendem a ser predominantes na próxima estação, que deve estar associado à evasão antigênica da imunidade do hospedeiro (Peret *et al.* 2000; Venter *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2005). Os vírus isolados em diferentes lugares e em diferentes epidemias podem apresentar semelhanças, reforçando que RSV dissemina-se amplamente no mundo inteiro (Anderson *et al.*, 1985; Coggins *et al.*, 1998).

Alguns genótipos podem predominar por anos. Choi & Lee observaram na comunidade na Coreia em um estudo por nove anos seguidos, a mudança do grupo A, com o desaparecimento de alguns genótipos e o aparecimento de novos genótipos na mesma comunidade. Os genótipos predominantes em mais de duas epidemias consecutivas tendem a aumentar em número por muitos anos e entram em declínio (Choi & Lee, 2000).

Por outro lado, em Estocolmo, na Suécia, um único genótipo dominou por quatro epidemias, especulando-se sobre a possibilidade que a variação na região A-terminal da proteína G pode permitir a dominância prolongada do genótipo. Entretanto, a função biológica da região A terminal variável da proteína G na imunidade ainda é desconhecida (Rafiefard *et al.*, 2004). Kuroiwa e col. observaram na Coreia que um genótipo epidêmico em 1980 e 1981 ressurgiu 20 anos depois (Kuroiwa *et al.*, 2004).

Em um estudo em comunidades nos Estados Unidos, Peret e col. observaram que o padrão de circulação de genótipos era distinto na maioria

das comunidades. Isso indica que o padrão de circulação das cepas do RSV durante surtos na comunidade é complexo, pois cepas iguais ou semelhantes circulam ao nível de uma comunidade durante um surto, e não necessariamente refletem no nível regional, nem nacional. Os autores suspeitam que fatores locais, assim como imunidade prévia cepa-específica contra o vírus e possivelmente a relativa aptidão do RSV circulante ditam qual vírus que irá circular na próxima estação (Peret *et al.*, 2000).

Muitos estudos de epidemiologia molecular concentram-se em países desenvolvidos com boas conexões aéreas para o resto do mundo. Portanto, a disponibilidade desses dados permite que se estude a dispersão viral para diversas partes do mundo. No estudo de Cane e col., em 1999, foi observado que em Gâmbia, na África, possivelmente, os RSV isolados eram efetivamente uma mistura de cepas circulando no mundo desenvolvido, entrando no país pela costa e distritos da área urbana, e cepas que eram derivados de regiões do interior dessa parte da África (Cane *et al.*, 1999).

A habilidade do vírus em causar reinfecções pode ser devido a uma inadequada resposta imune ou à variabilidade do vírus. A infecção natural pelo RSV fornece apenas imunidade protetora limitada. A proteína G está envolvida na neutralização e com a resposta protetora dos anticorpos. Ainda não está claro se a mudança nos genótipos do gene G pode explicar infecções repetidas. Consistentes mudanças de genótipos em muitas epidemias consecutivas sugerem que o aparecimento de um genótipo particular pode ser causado em parte por aumento da imunidade para aquele

genótipo, ocasionando uma vantagem seletiva na mudança da proteína G (Cane *et al.*, 1991; Choi & Lee, 2000).

Embora haja muitas especulações sobre a função da glicoproteína G na imunidade, é provável que haja outros fatores contribuintes para as reinfecções. Outro antígeno do RSV, a proteína F, que é extremamente sensível às mudanças na sequência dos aminoácidos, deve ganhar uma maior consideração e ser mais bem estudada (Wertz & Moudy, 2004).

Alguns estudos tentaram correlacionar diferença na morbidade de infecções definida por hospitalização e necessidade de ventilação mecânica com os diferentes grupos ou genótipos do RSV. Entretanto, a maioria deles não evidenciou tais diferenças (Anderson *et al.*, 1985; Cane, 2001; Kuroiwa *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004). Cintra e col. (2001) observaram que os pacientes que apresentavam o RSV do grupo B tinham leve tendência a desenvolver doença mais grave em relação pacientes infectados com o grupo A (Cintra *et al.*, 2001). Martinello e col., Fletcher e col., relataram que um determinado genótipo do grupo A é mais grave (Fletcher *et al.* 1997; Martinello *et al.*, 2002). Devincenzo sugeriu uma pequena correlação entre determinados subgrupos e uma maior carga viral (Devincozo, 2004).

De acordo com o estudo de Venter, sugere-se que a mesma cepa do vírus pode causar infecção branda no trato respiratório superior, infecção no trato respiratório inferior e grave doença respiratória. Mesmo em crianças expostas a fatores de risco semelhantes, provavelmente há outros fatores, assim como genética e a resposta imune individual, tendo maior influência na gravidade da doença do que as cepas infectantes (Venter *et al.*, 2002).

Mais recentemente, genótipos do tipo B estão surgindo e predominando em alguns locais do mundo. O novo genótipo BA, cuja característica é conferida pela inserção de 60 nucleotídeos na terceira região C-terminal da proteína G, predominou na epidemia de 2002 a 2003 em Sapporo no Japão (Sato *et al.*, 2005).

Essa mudança drástica na proteína G introduzida durante a propagação do RSV foi relatada em cepas nas epidemias do RSV em países da América do Sul (Argentina em 2001, Brasil em 2005 e Uruguai), no Japão e no Quênia. As cepas asiáticas e argentinas predominaram aproximadamente durante três epidemias com pequenas mudanças, o que atesta o alto vigor do vírus (Scott *et al.*, 2004; Blanc *et al.*, 2005; Galiano *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Reis, 2006; Trento 2006).

Nagai e col observaram um surto de infecção nosocomial de cepas idênticas do genótipo BA em um hospital no Japão. Os sintomas desses casos eram os mesmos das infecções do RSV causadas por genótipos comuns indicando que essa variante tinha uma patogenicidade como dos outros (Nagai *et al.*, 2004).

1.6 Diagnóstico laboratorial

As amostras clínicas do RSV são obtidas por aspiração ou lavado nasal de secreções de nariz ou nasofaringe ou por “swab” nasal. Devido ao RSV ser um vírus lábil, a amostra depois de colhida deve ser guardada sob refrigeração ou inoculada rapidamente (Collins *et al.*, 2001).

O diagnóstico do RSV varia laboratório para laboratório. Existem várias técnicas diagnósticas, entretanto, cada laboratório utiliza a técnica que lhe for conveniente. O isolamento viral em cultura de células é técnica clássica para diagnóstico do RSV, e considerado padrão ouro até recentemente. A confirmação do efeito citopático é feita pela detecção de antígeno por imunofluorescência (Collins *et al.*, 2001). Entretanto, há técnicas mais sensíveis para o diagnóstico do RSV e o padrão ouro vem sendo transferido para técnicas moleculares, como a reação de PCR (Tantivanich *et al.*, 1995; van Elden *et al.*, 2002; Reis, 2006).

Devido às dificuldades do isolamento viral em cultura de células, o diagnóstico do RSV utilizado em muitos de laboratórios de rotina é feito por detecção de antígenos do RSV em células epiteliais de nasofaringe, por imunofluorescência ou ensaio imunoenzimático. Esses métodos são rápidos, não necessitam de partículas virais viáveis e apresentam estabilidade nas lâminas fixadas. Entretanto, há necessidade de um técnico bem treinado para leitura das lâminas de imunofluorescência, já que pode haver inespecificidade devido à presença de muco na amostra. Outra desvantagem da técnica de imunofluorescência é que a lâmina deve conter um bom número de células, dessa forma a coleta, o transporte e processamento das amostras devem ser adequados para que as células não sejam destruídas (Kellogg, 1991; Tristram & Welliver, 1996).

O método de detecção do antígeno utilizando técnicas de imunofluorescência ou ensaio imunoenzimático apresenta variações de 75 a 95% de sensibilidade em crianças. Entretanto, em adultos, o título viral é mais

baixo, podendo ser um fator para redução na sensibilidade da técnica (Falsey & Walsh, 2000).

A sorologia pode ser útil para diagnóstico retrospectivo da infecção pelo RSV em crianças maiores e adultos. Um aumento de anticorpos no soro ou na saliva medidos por neutralização ou ensaio imunoenzimático revelou-se um bom indicador de reinfecção (Collins & Pollard, 2002).

A detecção do ácido nucléico do vírus por RT-PCR oferece maior sensibilidade em relação às técnicas citadas anteriormente e ainda permite o ensaio multiplex que detecta também outros vírus respiratórios simultaneamente (Hall, 2001).

Mais recentemente, diversos ensaios de PCR em tempo real foram desenvolvidos para o RSV (Borg *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2003; van Elden *et al.*, 2003; Boivin *et al.*, 2004; Dewhurst-Maridor *et al.*, 2004). O sistema baseia-se na detecção e quantificação de uma molécula repórter cujo sinal aumenta em proporção conforme a quantidade de amplificação do produto gerado (Niesters, 2001). Nessa técnica, não é necessária etapa pós-PCR como gel de eletroforese e hibridação. A eliminação da etapa de pós-PCR aumenta a rapidez do ensaio e reduz as chances de contaminação-cruzada, e conseqüentemente de resultados falso-positivos (Boivin *et al.*, 2004)

Já estão disponíveis técnicas de RT-PCR em tempo real que detecta, quantifica e tipa o RSV simultaneamente (Hu *et al.*, 2003). Borg e col relataram, em seu ensaio com sonda TaqMan, uma sensibilidade trinta vezes maior que um nested RT-PCR em pacientes com doença pulmonar (Borg *et al.*, 2003). Boivin e col. desenvolveram um ensaio multiplex para RSV e vírus

Influenza e encontraram 15% de sensibilidade a mais comparando com método de detecção de antígeno de RSV (Boivin *et al.*, 2004).

1.7 Epidemiologia

A infecção pelo RSV atinge todas as faixas etárias e o vírus distribui-se mundialmente. A infecção pelo RSV é mais comum em meninos do que em meninas. De um modo geral, quando o clima, a susceptibilidade imune e fatores sociológicos se associam, a epidemia de RSV afeta, especialmente, crianças menores, crianças desprotegidas imunologicamente, causando também doença em crianças mais velhas, adultos e idosos (Stensballe *et al.*, 2003).

O RSV surge em surtos no mundo inteiro, com menor atividade durante metade do ano e freqüentemente pico de intensa atividade num período de dois a quatro meses. A sazonalidade do RSV varia consideravelmente entre regiões. Em climas temperados, Mediterrâneo e deserto o RSV está associado com estação fria enquanto que, em climas tropicais associa-se com estação chuvosa (Weber *et al.*, 1998).

O fato de o RSV comportar-se de forma diferente, geralmente ocorrendo quando a umidade absoluta é alta nos trópicos e quando a temperatura é baixa em climas temperados, é de difícil explicação. É possível que essa sazonalidade do vírus não esteja relacionada a fatores climáticos, mas sim, a mudanças no comportamento social em determinadas estações ou a uma interação com outras infecções que são sazonalmente determinadas (Weber *et al.*, 1998).

De acordo com Waris & White, fatores como aumento da temperatura e maior incidência de luz ultravioleta contribuiriam para o declínio da infecção viral. Entretanto, o mais importante fator de declínio é provavelmente a redução da aglomeração de pessoas em locais fechados, visto que no verão há férias escolares e também reduz-se o número de crianças pequenas em hospitais (Waris & White, 2006).

No Brasil, na cidade de São Paulo, região sudeste subtropical, Vieira e col. observaram o início do surto no final de março ou começo de abril, e tendo o pico no mês de maio, o surto estende-se até o inverno (Vieira *et al.*, 2001). Silva e col, também encontraram o pico de circulação do RSV em maio durante anos seguidos em São Paulo em uma unidade de terapia intensiva (Silva *et al.*, 2004). Por outro lado, na região nordeste que apresenta clima tropical, Moura e col. relataram o surto na estação chuvosa, na primeira metade do ano (Moura *et al.*, 2006). Na região Sul, na cidade do Rio Grande do Sul, onde a temperatura é mais fria, o pico do surto é no inverno (Straliotto *et al.*, 2001).

A epidemia perde a força com a mudança de clima, aspectos comportamentais e a queda do número de pessoas susceptíveis ao longo da epidemia. Talvez essa combinação de fatores mais o reservatório do vírus em adultos com doença pulmonar obstrutiva crônica e indivíduos imunocomprometidos explicam a epidemia natural do RSV (Stensballe *et al.*, 2003).

1.8 Imunopatogênese

O aspecto clínico da infecção varia de acordo com a idade. A infecção primária ocorre de seis meses a dois anos de idade, geralmente sintomática e envolve o trato respiratório inferior. Infecções primárias assintomáticas pelo RSV são raras em crianças (Ogra, 2004).

Infecções repetidas em crianças mais velhas e em adultos são menos graves. Os sintomas comuns da infecção do RSV nesse grupo são rinorréia, congestão nasal, faringite e tosse. As infecções mais graves no trato respiratório são freqüentemente associadas à sibilância respiratório (causado por bronquiolite ou bronquite e asma), pneumonia e otite média aguda (Ogra, 2004). Em idosos, o RSV pode causar doença respiratória no trato inferior, sendo a pneumonia a complicação mais freqüente e levar à hospitalização (Falsey *et al.*, 1995; Dowell *et al.*, 1996).

Entre as crianças, a infecção pelo RSV causa de 50 a 90% de hospitalizações por bronquiolite, de 5 a 40% das hospitalizações por pneumonia e de 10 a 30% por traqueobronquite. Os grupos que apresentam maior morbidade na infecção pelo RSV, devido à sua fragilidade imunológica, são os neonatos, prematuros, indivíduos portadores de doenças cardíacas e os imunocomprometidos (Falsey & Wash 2000; Hall, 2001).

O RSV infecta predominantemente as células epiteliais de trato respiratório (Hacking & Hull, 2002). Uma vez que o vírus infecta o indivíduo, o período de incubação estimado do RSV é de cinco dias. No início da infecção, o vírus se replica na nasofaringe, alcançando altos títulos de até 10^6 TCID₅₀ (doses por mL de secreção nasal) em crianças pequenas. A migração do

vírus do trato respiratório superior ao trato inferior provavelmente envolve a aspiração de secreções ou migração via epitélio respiratório (Domachowske & Rosenberg, 1999).

A resposta imune contra o RSV, a princípio envolve defesas inespecíficas. As células epiteliais respiratórias, embora sejam os principais alvos da infecção pelo RSV são também as primeiras linhas de defesa inatas contra o vírus, juntamente com os macrófagos e células “*natural killer* (NK)”. A liberação de NF- κ B, como resultado da entrada do RSV no epitélio respiratório, estimula a transcrição de genes diretamente envolvidos na resposta antiviral (Harris & Werling, 2003).

Os macrófagos presentes nos alvéolos têm um importante papel na defesa inata contra o RSV, regulando a resposta imune seguinte através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-6 (IL-6) e IL-8 ou IL-10 que pode levar a imunossupressão local ou estimular uma resposta tipo TH2. Por outro lado, a produção de IL-12, que favorece o desenvolvimento de uma resposta tipo TH-1 e estimula as células NK, é inibida pelo RSV. A liberação de TNF e IL-10 é estimulada na presença de SPA (proteína produzida pelas células epiteliais) aumentando a opsonização do RSV e desse modo, aumentando a proteção (Harris & Werling, 2003).

A resposta imune não adaptativa também inclui mediadores inflamatórios, como quimiocinas, leucotrienos e citocinas quimiotáticas. Esses mediadores ajudam atrair células T, portanto, levam ao desenvolvimento da imunidade adaptativa com linfócito T auxiliar (Harris & Werling, 2003).

Crianças com uma infecção primária pelo RSV desenvolvem uma resposta imune celular dentro de 10 dias da infecção. Entretanto, não é bem determinada a função desses linfócitos CD4+ e CD8+ na infecção pelo RSV. Essas células podem reduzir a disseminação do vírus pelo pulmão ou aumentar os danos causados pela infecção (Hacking & Hull, 2002). De acordo com Graham e col. (2002), a patogênese crítica na primo-infecção é uma aberrante resposta da célula TCD8+, devido a mecanismos citolíticos ineficientes que levam à prolongada remoção do vírus (Graham *et al.*, 2002).

A infecção primária pelo RSV induz a resposta por anticorpos IgM em 5 a 10 dias, dependendo da idade do paciente. A resposta específica por IgG pode ser vista em muitos pacientes de 20 a 30 dias do início dos sintomas. Um ano após a primeira infecção os anticorpos IgG tendem a declinar. Após a reinfeção há um aumento nos níveis de IgG. Os anticorpos IgA, aparecem posteriormente, podem ser encontrados livres ou ligados às células nas secreções de nasofaringe. Os anticorpos IgE também podem ser encontrados da mesma forma do IgA (Ogra, 2004)

Os anticorpos contra a proteína F apresentam reatividade cruzada com os diferentes grupos antigênicos do RSV. Entretanto, a resposta contra a glicoproteína G é grupo específico (Walsh *et al.*, 1987; Cane, 1997). Embora, já tenha sido discutido sobre o papel da diversidade da glicoproteína G, outros fatores imunológicos devem ser levados em consideração em relação à imunidade ao vírus.

À medida que a idade das crianças aumenta e ocorrem reinfeções, a gravidade da doença vai diminuindo, ou seja, diminui chance de doença no

trato respiratório baixo e bronquiolite. A idade influencia em determinantes anatômicos na patogênese da doença. Entretanto, o acúmulo da experiência adquirida pela infecção sugere fortemente que fatores imunes, provavelmente por limitar a extensão e quantidade da replicação viral, influenciam nas características da doença associada com reinfecção (Henderson *et al.*, 1979).

Os anticorpos neutralizantes (contra as proteínas F e G) presentes nas reinfecções apresentam um importante papel na redução da gravidade da doença, bem como, como proteção à infecção pelo RSV, porém a proteção está distante de ser completa e duradoura (Kawasaki *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 1991). Por outro lado, nos indivíduos idosos, especula-se que ocorra um desequilíbrio na resposta imune celular Th1/Th2, fato que pode ocasionar maior morbidade pelo RSV nessa faixa etária (Looney *et al.*, 2002).

1.9 RSV em receptores de transplante de células-troncohematopoéticas

Após o transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH), a reconstituição do sistema imune é complexa e pode levar muitos anos para se completar. Ela começa ocorrer após a “pega medular”. Esse termo refere-se ao aumento do número de neutrófilos no sangue periférico e inicia-se a resposta imune inata celular. Posteriormente ao aumento de granulócitos, ocorre aumento de plaquetas e hemácias (Ross, 1996).

A recuperação da imunidade não ocorre de forma instantânea e também depende de muitos fatores, como o tipo de TCTH (autólogo, alogênico ou singênico), ocorrência de doença do enxerto contra o

hospedeiro, imunodepressão, estímulos antigênicos, idade, etc. De acordo com a revisão de Lum, nessa fase de recuperação pós-TCTH, muitos pacientes sofrem reinfecção por microorganismos devido à imunidade estar incompleta (Lum, 1987).

Nos receptores de transplante de células-troncos hematopoéticas (TCTH), Whimbey e col., no *Anderson Cancer Center*, nos Estados Unidos; Bowden e col. no *Fred Hutchinson Center Research Center*, também nos Estados Unidos; Ljungman e col. no *European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation*, em centros de transplante da Europa; Machado e col. na *Unidade de Transplante de Células-tronco Hematopoéticas do Hospital das Clínicas de São Paulo*, no Brasil; e Raboni e col. na *Unidade de Transplante de Células-tronco Hematopoéticas* da Universidade Federal do Paraná, também no Brasil, observaram que nos anos de seus estudos, o RSV é o vírus respiratório que mais afetava esses pacientes, causando graves complicações, como pneumonia, a qual pode levar à morte (Whimbey *et al.*, 1995; Bowden, 1997; Ljungman, 2001; Machado *et al.*, 2003; Raboni *et al.*, 2003).

A infecção pelo RSV inicia-se no trato respiratório superior progredindo para doença respiratória no trato respiratório inferior (DRTI) (Falsey & Walsh, 2000). Taxas de mortalidade em torno de 20% podem ser observadas em imunocomprometidos portadores de leucemia com pneumonia pelo RSV (Van Elden *et al.*, 2002).

Em unidades de TCTH a incidência de infecção por RSV nos pacientes é cerca de 6% (McCarthy *et al.*, 1999; Small *et al.* 2002). Cinquenta a 76 %

dos pacientes com infecção por RSV em trato respiratório superior desenvolvem pneumonia por esse vírus ocasionando taxa de mortalidade de 6,6 a 19,2% (Whimbey *et al.*, 1996; Bowden, 1997; McCarthy *et al.*, 1999; Ljungman, 2001; Small *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2003). No estudo de Whimbey e col., os pacientes que foram autopsiados por morte por pneumonia com infecção pelo RSV (sete de 12) apresentavam no tecido pulmonar células multinucleadas ou células gigantes com inclusão viral intracitoplasmática, características de pneumonia por RSV. O uso de anticorpos monoclonais confirmou o diagnóstico. Apenas um paciente apresentava co-infecção (candidíase disseminada) (Whimbey *et al.*, 1996).

Os pacientes transplantados passam por um esquema de quimioterapia com ou sem radioterapia, conhecido como regime de condicionamento que visa destruir os elementos imuno-hematopoéticos, diminuir a chance de recaída da doença e a rejeição do enxerto. Um dos efeitos imediatos do condicionamento é a ocorrência de mucosite. Esses danos podem facilitar a passagem do vírus ao trato respiratório (Hertz *et al.*, 1989).

O risco de pneumonia e morte nesse grupo nos receptores de TCTH está intimamente relacionado ao tempo pós-transplante. O primeiro mês pós-transplante é de alta morbidade para esses pacientes. De acordo com Harrington (1992), o período que antecede a “pega medular” também é crítico. Em seu estudo, os pacientes no período de pré-“pega medular” (de sete a 15 dias pós transplante) tendiam a desenvolver pneumonia mais freqüentemente que os indivíduos que já sofreram a “pega medular”, mas a mortalidade era

similar nesses grupos quando ambos tinham pneumonia (Harrington *et al.*, 1992). Whimbey e col. (1997) encontraram 70% de pneumonia por RSV no período correspondente ao primeiro mês pós-transplante (Whimbey *et al.*, 1997).

Embora, com menor morbidade, o RSV também pode causar pneumonia em pacientes em período tardio pós-transplante (Khushalani *et al.*, 2001). De acordo com Martino (2005), mais fatores de risco estão envolvidos na primeira infecção pós-transplante por vírus respiratórios e sua progressão clínica: excreção viral prolongada na infecção no trato superior e progressão a DRTI (Martino *et al.*, 2005).

Frente à importância da infecção por RSV nesses pacientes imunodeprimidos, segundo as recomendações do *Center of Control of Infectious Diseases e Prevention e American Society of Blood and Bone Marrow Transplantation*, caso haja DRTI e for diagnosticada uma infecção por RSV no período pré-transplante, o transplante deve ser adiado (Sullivan *et al.*, 2001).

Em seu estudo retrospectivo no *Fred Hutchinson Center Research Center*, nos Estados Unidos, Peck e col. analisaram receptores de TCHT que tiveram ou não o transplante adiado caso após a confirmação de infecção pelo RSV. Os pacientes cujo transplante foi adiado, apresentaram menor risco de desenvolver pneumonia, enquanto que a maioria dos pacientes cujo transplante foi realizado diante à infecção desenvolveram pneumonia (Peck *et al.*, 2004).

1.9.1 Prevenção e Tratamento

Atualmente, a ribavirina inalatória é o único medicamento licenciado para o tratamento da infecção pelo RSV. A ribavirina é um análogo de nucleosídeo sintético que atua na inibição da replicação viral de vírus DNA e RNA, inibindo a síntese de proteínas virais estruturais (Chidgey & Broadley, 2005).

Alguns mostram que a terapia precoce à infecção do RSV aumenta a sobrevivência dos receptores de TCTH (Ottolini & Hemming, 1997; McColl *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1999). Alguns autores relatam aumento da sobrevivência desses pacientes com a combinação do tratamento com ribavirina e anticorpos neutralizantes (De Vincenzo *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2000). Boeckh e col. realizaram um estudo randomizado com a administração de ribavirina 2 vezes ao dia em receptores de TCTH com infecção por RSV em vias aéreas superiores. Os autores notaram redução da progressão à pneumonia e diminuição da carga viral nos pacientes que haviam recebido o tratamento (Boeckh *et al.*, 2007). Entretanto, a maioria dos estudos ainda não é consistente em relação à eficácia da ribavirina.

Atualmente, dois tipos de imunoglobulinas contra o RSV estão disponíveis para prevenção do RSV: imunoglobulina RSV-específica (RSV-IGIV; Respigam, MedImmune Inc.) e palivizumab (Synagis, MedImmune, Inc.). A RSV-IGIV é uma preparação policlonal contendo anticorpos neutralizantes concentrados produzidos do soro de adultos humanos. O palivizumab é um anticorpo monoclonal IgG quimérico humanizado produzido

por tecnologia recombinante direcionado a um epítopo do domínio A da proteína F (Chidgey & Broadley, 2005).

Outra forma de prevenção seria vacina, porém, o desenvolvimento de uma vacina contra o RSV é complicado pelo fato de a resposta imune contribuir para a patogênese da doença. Dois tipos de vacinas estão sendo desenvolvidos no momento para diferentes grupos de indivíduos (Girard *et al.*, 2005).

A imunização por vacinas de subunidades deve ser útil para idosos, mães grávidas e crianças de alto-risco. A administração de vacinas candidatas baseadas na proteína F purificada mostrou segurança em adultos saudáveis, em crianças maiores de um ano, com ou sem doença respiratória, em idosos e mulheres grávidas (Girard *et al.*, 2005).

Por outro lado, a imunização por vacinas atenuadas vivas tem preferência em crianças sem histórico de infecção pelo RSV. Essa vacina pode ser administrada pela mucosa nasal através da imunização intranasal. A dificuldade para o desenvolvimento dessa vacina consiste alcance do equilíbrio entre uma alta ou baixa atenuação do vírus e da limitada estabilidade genética (Girard *et al.*, 2005).

O principal objetivo da vacinação contra o RSV não é prevenir a infecção, mas especialmente prevenir suas complicações, ou seja, a infecção do trato respiratório inferior (Dudas & Karron, 1998).

Enfim, de acordo com Couch e col. (1997) há três categorias gerais de opções de controle para as infecções respiratórias que são: a prevenção da

exposição; fornecimento da imunidade e administração de antivirais. (Couch *et al.*, 1997).

1.9.2 Infecção Nosocomial

Há três vias de transmissão do RSV. A primeira é por pequenas partículas de aerossol, geralmente por tosse ou espirros, não sendo necessário contato direto. A segunda via é por gotas ou partículas maiores, isso requer contato direto de pessoa a pessoa. A terceira via e a mais importante delas é a contaminação de superfícies que pode ser transmitida à pele e permanecer tempo suficiente para auto-inoculação no trato respiratório. A facilidade da transmissão desse vírus respiratório, provavelmente, é a responsável pela ocorrência de infecções hospitalares (Hall, 2000).

Em seus estudos em uma unidade de TCTH, Whimbey e col. observaram que em torno de 50% das infecções pelo RSV são adquiridas por transmissão intra-hospitalar. Nesses estudos, a infecção hospitalar foi definida pela presença de sintomas sete dias após internação e posterior confirmação virológica (Whimbey *et al.*, 1996; Whimbey *et al.*, 1997).

Diferentes cepas do RSV podem ser introduzidas no hospital. Uma vez introduzido na unidade, o vírus infecta outras pessoas. A infecção intra-hospitalar é adquirida provavelmente por exposição a uma pessoa infectada ou contato com superfícies contaminadas. As pessoas transmissoras do vírus podem ser: os funcionários do hospital (incluindo enfermeiras, médicos); os pacientes e a visita de familiares (principalmente crianças). Um fator contribuinte para a transmissão e aquisição dessas infecções é a estadia prolongada destes pacientes imunodeprimidos e sua longa excreção viral

(Englund *et al.*, 1991; Storch *et al.*, 1993; Couch *et al.*, 1997; Mazzulli *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2001).

De acordo com Hall, embora a maioria dos funcionários infectados pelo RSV seja sintomática, a excreção do vírus ocorre em cerca de 20% dos funcionários assintomáticos, o que pode ser uma importante fonte de transmissão do vírus em hospitais (Hall, 2000).

Medidas preventivas devem ser adotadas para redução da infecção nosocomial, tais como: programa de educação continuada aos funcionários do hospital com relação à infecção pelo RSV; diagnosticar a infecção do RSV em funcionários e pacientes; uso de máscara, avental e luvas para o contato com pacientes infectados ou com sintomas (isolamento de contato); lavagem das mãos; proibição de visitas com sintomas de infecção respiratória; afastamento temporário dos funcionários sintomáticos, isolamento dos pacientes infectados ou na ausência de leitos disponíveis; colocação de pacientes com a mesma infecção no mesmo quarto (Raad *et al.*, 1997).

De acordo com as recomendações de *The Centers for Disease Control and Prevention*, *Infectious Diseases Society of America*, e *American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines and Beyond*, o isolamento de contato deve ser instituído para todos os pacientes sintomáticos, ainda antes da confirmação virológica (Sullivan *et al.*, 2001).

No acompanhamento de oito epidemias do RSV em um hospital pediátrico, ao adotar medidas preventivas à infecção hospitalar pelo RSV, Macartney e col. conseguiram reduzir a incidência do RSV adquirido dentro do hospital em 39% e ainda economizar recursos que seriam gastos no

tratamento dos possíveis doentes pelo RSV (Macartney *et al.*, 2000). Essas intervenções incluíam: reconhecimento precoce dos pacientes com sintomas de infecção respiratória, confirmação da infecção pelo RSV por testes laboratoriais, estabelecimento de “*cohorting*” de pacientes e equipe de enfermagem, uso de luvas e máscaras, monitoramento e programa educacional aos funcionários. Já em relação a unidades de TCTH, também houve redução nas taxas de incidência após a adoção de medidas preventivas à infecção hospitalar (Garcia *et al.*, 1997).

Enfim, para interromper a transmissão nosocomial em hospitais, particularmente em unidade de transplante de células-tronco hematopoéticas, onde a morbidade pela infecção pelo RSV é grande, é essencial que a equipe de controle de infecção hospitalar seja informada precocemente do diagnóstico de infecção respiratória em todos pacientes, para que medidas apropriadas sejam implementadas (Aitken & Jeffries, 2001).

Atualmente, o termo “infecção hospitalar” vem sendo gradualmente substituído por infecção em serviços de saúde, termo que abrange infecções em áreas emergentes tais como assistência domiciliar, hospitais de pacientes crônicos, clínicas de procedimentos ambulatoriais, etc (Maragoni & Santos, 2005). Neste trabalho, daqui a diante, o termo atual “infecção em serviços de saúde” será adotado.

JUSTIFICATIVA

Poucos estudos caracterizando as cepas do RSV foram feitos em unidades de internação, e principalmente em ambulatório, que atende receptores de Transplante de Células-tronco Hematopoéticas (TCTH). Tendo em vista a grande importância dessas infecções nesses pacientes e a ausência de estudos similares em nosso meio, este projeto buscou caracterizar epidemiologicamente as cepas de RSV detectados nos receptores de TCTH do Hospital das Clínicas da FMUSP entre abril de 2001 a dezembro de 2003.

II OBJETIVO

II OBJETIVO

- ✓ Caracterizar de forma molecular as cepas do RSV encontradas nos receptores de Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas do Hospital das Clínicas nos surtos de 2001 e 2002.

III CASUÍSTICA E MÉTODOS

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. População estudada

Amostras de lavado de nasofaringe (LNF) de receptores de TCTH, com sintomas de infecção do trato respiratório superior, foram colhidas no período de 2001 a 2002. Esses pacientes estavam internados na enfermaria ou freqüentavam o ambulatório (hospital-dia) da Divisão de Transplante de Células-tronco Hematopoéticas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2 Características das unidades de internação e ambulatório de TCTH

3.2.1 Unidades de internação

Os receptores de TCTH eram internados em quartos individuais nessa unidade para o transplante ou em caso de complicações pós-transplante. A unidade de TCTH apresentava seis quartos com ar filtrado e pressão positiva, separados da unidade de internação da Hematologia por uma ante-sala. Na enfermaria da Hematologia, não há ambientes de ar filtrado e pressão positiva e dois pacientes podem ocupar o mesmo quarto, se necessário. Receptores de transplante de TCTH com diagnóstico de infecção por vírus respiratórios e/ou em tratamento com ribavirina inalatória eram transferidos da unidade de transplante para a Hematologia a fim de minimizar a dispersão de vírus respiratório pelo ar em função da pressão positiva desses quartos.

3.2.2 Ambulatório

O ambulatório de TCTH atende pacientes em diversos períodos pós-transplante. Nesse local eram realizadas as coletas de exames e era feito todo o atendimento médico, como consultas e infusão de medicação. O ambulatório funcionava diariamente das 7.00 às 19.00h.

Os pacientes partilhavam, por longos períodos, o salão de medicação que continha seis poltronas pantográficas, os sanitários e uma pequena sala de espera. O local de coleta de amostras para exames era o salão de medicação. O atendimento médico era feito em salas isoladas (consultórios) que eram também utilizadas para o “cohorting” de pacientes com infecções por vírus respiratórios e que necessitavam receber medicação no ambulatório (foto do local vide anexo D).

3.3 Definições

3.3.1 Infecção em serviços de saúde

Transmissão cruzada ou intra-hospitalar do vírus foi definida para os pacientes internados na enfermaria.

Infecção de origem nosocomial pelo RSV foi definida pela presença de sinais e sintomas de doença respiratória no trato superior e/ou doença respiratória no trato inferior em associação com os seguintes critérios: (1) ausência de sinais ou sintomas de doença respiratória na admissão; (2) teste de imunofluorescência direta negativa para o RSV em amostra de secreção respiratória na admissão, e (3) teste de imunofluorescência direta positiva ao

menos cinco dias após a admissão (baseado na média do período de incubação do RSV que é de 5 dias) (Garcia *et al.*, 1997).

3.3.2 Período de diagnóstico positivo para o RSV

O período de diagnóstico positivo para o RSV foi estabelecido pelo período que as amostras respiratórias sucessivas dos pacientes mostravam-se positivas para o RSV pelas técnicas de imunofluorescência direta e/ou PCR.

3.3.3 Infecção no trato respiratório superior e trato inferior

A infecção no trato respiratório superior era definida como a presença de coriza, faringite e/ou tosse com ou sem febre e radiografia do tórax limpa. Infecção no trato respiratório inferior foi definida pela presença de sibilo, hipóxia ou pneumonia com radiografia com infiltrado de aparecimento recente.

3.4 Medidas de controle de infecção por vírus respiratórios

3.4.1 Unidade de internação:

- ✓ Coleta de lavado de nasofaringe de todos os pacientes sintomáticos para pesquisa de vírus respiratórios por imunofluorescência direta;
- ✓ Isolamento de contato nos casos positivos;
- ✓ Proibição de visitas de crianças menores de 12 anos de idade;
- ✓ Retirada dos pacientes dos quartos com pressão positiva no caso de detecção de vírus respiratórios e transferência para quartos da Hematologia, conforme citado anteriormente.

3.4.2 Ambulatório da unidade TCTH:

- ✓ Coleta de lavado de nasofaringe de todos os pacientes sintomáticos para pesquisa de vírus respiratórios por imunofluorescência direta;
- ✓ Uso de máscara na unidade em caso de sintomas respiratórios e/ou diagnóstico de vírus respiratórios;
- ✓ Uso de lençóis descartáveis nas cadeiras pantográficas;
- ✓ Uso de um consultório individualizado compartilhado, se necessário, com outros pacientes infectados pelo RSV (*“cohorting”*).

3.5 Conduta mediante infecção pelo RSV

Pacientes com diagnóstico de infecção pelo RSV recebiam tratamento com ribavirina inalatória nas seguintes situações: presença de infecção em trato respiratório baixo demonstrada por raio X de tórax e/ou tomografia computadorizada; diagnóstico de RSV antes da enxertia da medula óssea ou pacientes com DECH aguda ou crônica.

O tratamento era feito com ribavirina inalatória administrada pelo nebulizador SPAG – 2, administrado por máscara na dose de 6g/dia (20 mg/mL durante 18h à noite) por sete dias. Em associação, imunoglobulina endovenosa era administrada em dias alternados na dose de 500 mg/kg.

Frente ao diagnóstico de RSV, coletas de lavado de nasofaringe (LNF) eram colhidas a cada dois dias, tanto em pacientes internados como atendidos no ambulatório. Os pacientes eram retirados do isolamento de contato após duas amostras negativas com intervalo de uma semana.

3.6 Métodos Laboratoriais e de análise

O fluxograma dos métodos laboratoriais está mostrado na figura 4.

3.6.1 Coleta das amostras e identificação do RSV

As amostras de lavado de nasofaringe estudadas foram obtidas de receptores de TCTH e pacientes que estavam no período de condicionamento pré-TCTH, que apresentaram sintomas de infecção respiratória entre abril de 2001 a dezembro de 2002.

As amostras de lavado nasal foram coletadas de acordo com Englund *et al.* (1996) e processadas por imunofluorescência direta (IFD) com anticorpo monoclonal para o RSV com kit Dako (Imagen, Dako, Cambridgeshire, Reino Unido) para o projeto “Virose respiratórias em receptores de transplante de medula óssea” realizado nos anos de 2001, 2002 e 2003.

O diagnóstico de infecção pelo Vírus Sincicial Respiratório foi feito em 21 dos 141 pacientes analisados em 2001 e 22 dos 181 pacientes em 2002.

3.6.2 Estocagem das amostras

Após preparação da lâmina para IFD, o restante da amostra foi aliquoteado e estocado em tampa de lise. Foram utilizados 400µl de lavado de nasofaringe para 600µl de tampão de lise para a estocagem da amostra clínica em freezer à temperatura de -70°C .

Quando a quantidade de material foi insuficiente para estocagem, foi dada prioridade ao diagnóstico rápido pela imunofluorescência direta (IFD) no projeto “Virose Respiratórias”.

3.6.3 Extração do RNA total

A extração de RNA foi realizada em uma sala separada do laboratório, onde há manipulação das amostras e é específica para extração de ácidos nucléicos.

As extrações de RNA de amostra clínica de lavado de nasofaringe contavam com um controle positivo (RSV de cepa padrão A2 isolado em cultura de células) e controle negativo (cultura de células permissivas para RSV negativa).

O RNA das amostras positivas para RSV diagnosticado por imunofluorescência foi extraído pelo método de extração com sílica-gel (Nuclisens® Biolab-Mérieux).

As amostras contendo 400µl de amostra e 600µl de tampão de lise 5 mol/L (Nuclisens® Biolab-Mérieux,) foram retiradas do freezer e foram adicionados 50µl de sílica (Nuclisens® Biolab-Mérieux), e essas foram homogeneizadas e mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos, afim de se obter a ligação da sílica ao RNA. Após, os tubos contendo as amostras foram centrifugados por 20 minutos a 6800 xg e o sobrenadante foi aspirado à vácuo. A seguir, foram adicionados 1000 µl de tampão de lavagem (Nuclisens® Biolab-Mérieux). Os tubos foram homogeneizados vigorosamente no agitador de tubos até que se dissolvesse o “*pellet*” formado e a seguir, centrifugados por 20 minutos a 6800 xg. Após, o sobrenadante foi desprezado. O procedimento com o tampão de lavagem foi repetido duas vezes. A solução contendo a amostra do RNA viral foi lavada duas vezes com etanol 70% (Merck, Darmstadt, Alemanha), realizando-se centrifugação

durante 20 minutos por 6800 xg e uma vez com acetona pura (Merck, Darmstadt, Alemanha). A seguir, o RNA extraído foi seco por 10 minutos a 56°C e foram adicionados 50 µl de tampão de eluição (Nuclisens® Biolab-Mérieux). Após, os tubos foram agitados no agitador de tubos e centrifugados durante um minuto a 15300 xg. O RNA extraído foi estocado no freezer à temperatura de -70°C ou foi feita a transcrição reversa.

3.6.4 Transcrição reversa

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada dentro de um fluxo laminar e uma sala diferente à sala de extração.

Para a síntese de cDNA foram preparados duas misturas. Foram adicionados 22 µl do RNA extraído na mistura I. Essa foi preparada com os seguintes reagentes com suas respectivas concentrações finais: buffer (1,0X) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), desoxiribonucleotídeos (dNTPs) (0,2mM) (Invitrogen), MgCl₂ (5,0mM) (Invitrogen), enzima inibidora de ribonuclease (40U) (RNaseout, Invitrogen), DTT(103M) (Invitrogen) e água DEPC (Gibco). Essa mistura junto ao RNA foi aquecida no termociclador *Mastercycler Gradient Eppendorf 5331* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), a 65°C por 5 minutos para linearizar a fita de RNA e após, à temperatura de 22°C, a mistura II foi adicionada. A mistura II foi preparada com iniciadores randômicos (2,5 µM) (Invitrogen), M-MLV (enzima transcriptase reversa) (2,5U) (Invitrogen). O volume final da reação era de 45 µl. Uma vez adicionada a mistura II à amostra, ocorreu o emparelhamento dos iniciadores randômicos à temperatura de 22°C por 15 minutos. A síntese do cDNA foi

realizada a 37°C por 30 minutos e à 95°C, por 5 minutos, a reação foi cessada.

3.6.5 Amplificação

A montagem das reações de PCR foi realizada em uma sala de pré-PCR dentro de um fluxo laminar, onde após cada montagem de reação e manipulação de cDNAs, o fluxo era limpo com álcool 70% e a luz ultravioleta era acesa.

As reações de PCR contavam com um controle positivo (cDNA de RSV de cepa padrão A2 isolado em cultura de células) e controle negativo (água adicionada à mistura no lugar da amostra).

1ª etapa

A amplificação do cDNA foi efetuada por PCR com iniciadores complementares aos RNAs mensageiros das proteínas de fusão (F) e adesão (G). Primeiramente foi preparada uma mistura de reagentes com as respectivas concentrações finais: tampão de reação (Invitrogen®) (1X); dNTPs (Invitrogen®) a 0,2mM; MgCl₂ a 1,5mM; iniciadores FV(anti-senso) e GAB(senso)(Invitrogen®) a 0,5 µM e; enzima taq polimerase (Invitrogen®) a 2 unidades e; água bi destilada auto-clavada em um volume final de reação de 50 µl. A sequência dos iniciadores está mostrada na tabela 1. A seguir, 5µl da amostra de cDNA foi adicionada à mistura. O volume final da reação era de 50 µl. Posteriormente, a amostra junto à mistura foram colocada no termociclador *Mastercycler Gradient Eppendorf 5331* (Gradient Eppendorf,

Hamburg, Alemanha), cujo programa era: 10 minutos a 95°C; 1 minuto a 94°C, 55°C e 72°C em 35 ciclos; e 7 minutos a 72°C para extensão final.

2ª etapa

Foi realizada a reação “*semi-nested*” PCR. Foi feita outra mistura de reagentes contendo: tampão de reação (1x concentrado), dNTPs a 0,25mM, MgCl₂ a 1,5 mM, iniciador F1AB (anti-senso) e GAB(senso) a 0,3 µM, taq polimerase (2 unidades) e água bidestilada auto-clavada. Foram adicionados 5µl do DNA amplificado na primeira etapa a essa mistura. A seguir, a amostra junto à mistura foi colocada no termociclador *Mastercycler Gradient Eppendorf* 5331, cujo programa era igual ao da primeira etapa.

Tabela 1- Seqüência dos iniciadores utilizados nas reações de PCR

<i>Iniciador</i>	<i>Posição (nucleotídeo - nt)</i>	<i>Seqüência (5'-3')</i>
F1AB (anti-senso)*	3-22 - proteína F	CAACTCCATTGTTATTTGCC (Peret <i>et al.</i> , 1998)
FV (anti-senso)	163-186 proteína F	GTTATGACACTGGTATACCAACC (Zheng <i>et al.</i> , 1996)
GAB (senso)*	504-524 proteína G	YCAYTTTGAAGTGTTCAACTT (Peret <i>et al.</i> , 2000)

* iniciador também utilizado na reação de seqüência

3.6.6 Análise dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Uma mistura de 10µl do produto amplificado e 2µl de tampão de corrida (bromofenol azul) foi aplicado em um gel de agarose (ultra pura

GIBCO- BRL, Gai Hersburg, MD, EUA) contendo 1,5% de agarose tampão TAE 0,1X (40mM Tris acetado e 1mM de EDTA, Gibco) em cuba horizontal, com a adição de brometo de etídio no gel numa concentração final de 0,4µg/ml. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb a 0,25µg (GIBCO-BRL, Gai Hersburg, MD, EUA). O gel foi submetido à eletroforese em uma carga de 90 volts por 30 minutos. A leitura do gel foi feita em transluminador de luz ultravioleta e foi fotografado (Alphalmager EC, Alpha Innotech Corporation).

3.6.7 Purificação do produto de PCR

Os produtos da semi nested PCR foram purificados a fim de remover dNTPs e iniciadores residuais da reação de PCR, utilizou-se o kit Microcon Millipore Purification (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). Adicionou-se 400µl de água DEPC (Gibco) em uma coluna contida em um tubo de 1,5 ml. A seguir, foram adicionados 40 µl do produto de PCR à coluna. Os tubos foram levados à centrífuga (Eppendorf®) e centrifugados a 500xg por 15 minutos. A seguir, os tubos foram retirados das colunas e descartados e as colunas foram colocadas invertidas em tubos novos. Foram adicionados mais 40 µl de água DEPEC a cada coluna e os tubos foram novamente levados à centrífuga e centrifugados a 500xg por 5 minutos. As colunas foram removidas e descartadas e as amostras de DNA foram retidas no tubo. O produto de PCR foi purificado.

3.6.8 Quantificação do DNA

Os produtos purificados foram submetidos à corrida em um gel de agarose 1,5% (conforme já descrito) e quantificadas com o auxílio do marcador de massa molecular (*DNA Mass Leader*, Gibco BRL). A quantidade dos produtos de PCR de cada amostra foi comparada às intensidades das bandas do marcador de massa molecular pela foto do gel.

3.6.9 Reação de Seqüenciamento

Para cada amostra foram feitas duas reações em paralelo utilizando-se os iniciadores GAB e F1AB. Foi utilizado o kit Big Dye v2,0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para cada reação com o iniciador GAB, o DNA amplificado da amostra (30-90ng) foi misturado a uma mistura de reagentes contendo: 8µl de Terminator Ready Reaction mistura, tampão Save Money (Applied Biosystems), iniciador GAB (4,0 pmoles) e água qsp, num volume final de reação de 20 µl. O mesmo procedimento foi repetido para o iniciador anti-senso FAB. A reação foi levada ao termociclador *Eppendorf*, cujo programa era: aquecimento a 96°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos, em 25 ciclos.

3.6.10 Precipitação do DNA

A precipitação foi realizada a fim de se remover o excesso de dideoxinuclotídeos terminadores presentes na reação de seqüência. O método utilizado foi de precipitação por isopropanol. Primeiramente, foi transferido o conteúdo total da reação de extensão para os microtubos de

microcentrifuga e foram adicionados 80µl de isopropanol 75% e agitou-se no agitador de tubos. Após, os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 15 minutos para a precipitação dos produtos de extensão. A seguir, os tubos foram centrifugados por 20 minutos. Passado esse tempo, o sobrenadante foi retirado, foram adicionados 250µl de etanol 75% e os tubos foram agitados no agitador de tubos. Após, os tubos foram centrifugados por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram secas no “*speed vacuum*”. A seguir, o pellet da amostra foi ressuspensão com formamida e corante e o DNA das amostras foi denaturado à 95°C por 2 minutos e após, foram refrigerados em blocos de metal refrigerados.

3.6.11 Seqüenciamento e análise das seqüências

As amostras foram corridas no seqüenciador *ABI PRISM 377 DNA sequencer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os eletroferogramas foram analisados com programa *Seq Man* (DNASTAR, Inc, EUA para PC) de modo a obter um segmento de 270 nucleotídeos correspondente à segunda região variável do gene codificador da glicoproteína G, designada como G2, que compreende os nucleotídeos 649-918 para o grupo A e 652-921 para o grupo B (Peret *et al.*, 1998).

3.7 Análise dos dados e construção das topologias

As seqüências foram alinhadas com o programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) e convertidas em arquivos no formato NEXUS.

Seqüências do RSV circulante na comunidade nos anos de 2001, 2002 e 2003 adquiridas de crianças atendidas no Hospital Universitário da USP foram cedidas gentilmente por Daniele Bruna, Dra. Viviane Botosso e Prof.^o Edison Luiz Durigon do Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Duas seqüências de RSV isoladas de receptores de TCTH no ano de 2003 (paciente 1171 e paciente 976) também foram incorporadas na análise. Essas seqüências foram incluídas na análise a fim de obter um perfil das cepas circulantes nesses anos, verificar se a cepa circulante na unidade de TCTH tinha o mesmo perfil das cepas da comunidade ou se era uma cepa restrita a esse local e se as cepas circulantes no ano já haviam circulado em ano anterior ou circularia em ano seguinte. As árvores filogenéticas foram construídas através de alinhamentos do grupo A e amostras do grupo B, usando o método de máxima verossimilhança com o programa PAUP*4.0 versão Beta – Sinauer Associates, Inc, (Swofford, 1998), para Power Macintosh e Unix.

Para a realização da genotipagem das amostras, seqüências foram adquiridas do GeneBank de acordo com Peret e col., e Venter e col., e foi utilizado o método de distância utilizando-se o algoritmo *Neighbor Joining* (Saitou and Nei, 1987) com o programa PAUP*4.0 versão Beta – Sinauer Associates, Inc, (Swofford, 1998), para Power Macintosh e Unix (Peret *et al.*, 1998; Venter *et al.*, 2002) (vide apêndice).

3.8 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética par Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP)(protocolo nº047/05) (Vide Anexo A).

Esse grupo seguido na Divisão de Transplante de Células-tronco Hematopoéticas do Hospital das Clínicas de São Paulo assinou termo de consentimento livre e esclarecido para o projeto “Virose Respiratórias em receptores de Transplante de Medula Óssea” e teve sua aprovação do comitê de ética da CAPPesq em 2001(protocolo nº 589/01) (Vide anexos B e C).

IV RESULTADOS

IV. RESULTADOS

4.1 Amostras estudadas

Das 21 amostras positivas por imunofluorescência direta para o Vírus Sincicial Respiratório no ano de 2001, sete puderam ser analisadas. Em relação às amostras do ano de 2002, das 22 amostras positivas, 12 puderam ser analisadas.

Entretanto, como o objetivo deste trabalho não foi comparar a positividade entre a técnica de biologia de molecular e imunofluorescência, mas sim analisar as cepas virais, as amostras que puderam ser recuperadas por biologia molecular foram analisadas.

4.2 Características da população estudada

As características dos pacientes receptores de transplante de células-tronco hematopoéticas que tiveram a cepa do RSV analisada estão mostradas nas tabelas 2 e 3. A tabela 2 refere-se aos pacientes do ano de 2001 e a tabela 3 aos pacientes de 2002.

Os pacientes do ano de 2001, a maioria era do sexo feminino. A idade dos pacientes no momento em que foi diagnosticada a infecção variou de 37 a 51 anos, apresentando média de 41,5 anos e mediana de 39 anos. O tempo pós-transplante no momento em que ocorreu o diagnóstico da infecção variou de -6 a 1947 dias, apresentando média de 392 dias e mediana de 14 dias. A maioria dos pacientes sofreu transplante alogênico e apresentava leucemia mielóide crônica como doença de base, as outras eram: leucemia mielóide aguda, mieloma múltiplo e linfoma não Hodgkin.

No ano de 2002 a maioria dos pacientes também era do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 8 a 51 anos, apresentando média de 31,8 anos e mediana de 31 anos. O tempo pós-transplante no momento variou de -13 a 3786 dias, apresentando uma média de 462,75 e mediana de 123 dias. A maioria dos pacientes sofreu transplante alogênico e apresentava leucemia mielóide crônica como doença de base, seguida por leucemia mielóide aguda e mieloma múltiplo.

Tabela 2– Características dos pacientes infectados pelo RSV no ano de 2001

paciente	sexo*	idade**	tipo de transplante	dia pós transplante	doença de base	Unidade de TCTH**
687	M	37,06	alogênico	754	LMC	Ambulatório
445	F	51,93	alogênico	1947	LMC	Ambulatório
997	M	42,76	alogênico	2	LMC	Ambulatório
1034	F	32,19	alogênico	25	LLA	Ambulatório
1032	F	49,48	autólogo	14	MM	Ambulatório
1023	M	38,13	autólogo	-6	LNH	Enfermaria
1152	F	39	alogênico	6	LMC	Ambulatório

*as abreviaturas da coluna "sexo" correspondem à: F-feminino M-masculino** idade do paciente no momento em que foi diagnosticada a infecção *** local onde o paciente se encontrava no momento em que foi diagnosticada a infecção

Tabela 3 – Características dos pacientes infectados pelo RSV no ano de 2002

paciente	sexo*	idade**	tipo de transplante	dia pós transplante*	doença de base	Unidade de TCTH***
147	F	50,92	alogênico	3786	LMC	Ambulatório
1322	F	28,34	alogênico	57	LMA	Ambulatório
1329	M	37,99	alogênico	42	LMC	Ambulatório
1370	F	38,82	alogênico	-13	LMC	Ambulatório
1321	F	29,2	alogênico	62	LMC	Ambulatório
1149	M	14,4	alogênico	326	LLA	Ambulatório
817	M	8,14	alogênico	155	LLA	Ambulatório
1220	F	46,21	autólogo	276	MM	Ambulatório
1328	F	29,15	alogênico	59	LMA	Ambulatório
858	F	21,66	alogênico	557	LMA	Ambulatório
1248	M	44,06	alogênico	134	LMC	Ambulatório
1308	M	32,81	autólogo	112	MM	Ambulatório

* as abreviaturas da coluna "sexo" correspondem à: F-feminino M-masculino** idade do paciente no momento em que foi diagnosticada a infecção *** local onde o paciente se encontrava no momento em que foi diagnosticada a infecção

4.3 PCR

O produto da primeira etapa resultava em fragmento de 653 pares de bases (pb) para amostras do grupo A e 656 pb para amostras do grupo B. O fragmento gerado pela reação “*semi nested PCR*” resultou em fragmentos de 489 para amostras do grupo A e 492 para amostras do grupo B (figura 5).

Figura 5- Foto de gel de agarose (gel 1,5% corado com brometo de etídeo) do produto do RSV amplificado por “*semi nested RT-PCR*”. As bandas das amostras 1 e 2 correspondem ao produto do 2ª etapa (em torno de 490 pb), a banda da amostra 4 corresponde ao produto da 1ª etapa (em torno de 650 pb).

4.4 Análise das cepas virais

Das sete cepas analisadas dos pacientes infectados em 2001, cinco pertenciam ao grupo A e duas ao grupo B (tabela 4). Três cepas do grupo A desse ano foram consideradas altamente relacionadas. Uma cepa do grupo B

do ano de 2001 era altamente relacionada a uma cepa do ano de 2002. (figura 6). Uma cepa do grupo A também era altamente relacionada a uma cepa do ano de 2002 (figura 7). O genótipo predominante nesse ano foi o GA2, seguido pelo GA5 e SAB1 (tabela 4).

A figura 8 mostra a análise genotípica das amostras encontradas do grupo A e a figura 9 mostra a análise genotípica das amostras encontradas do grupo B.

Das doze cepas analisadas do ano 2002, oito cepas pertenciam ao grupo B e quatro, ao grupo A (tabela 5). Sete cepas do grupo B desse ano foram consideradas altamente relacionadas entre elas (figura 7). O genótipo predominante nesse ano foi o SAB3, seguido pelo SAB1 e GA2 (tabela 4).

Tabela 4- Grupo e genótipo do RSV dos pacientes infectados em 2001

Nº Paciente	Grupo do RSV	Genótipo
687	B	SAB1
997	A	GA2
445	B	SAB1
1034	A	GA2
1032	A	GA2
1023	A	GA5
1152	A	GA5

Tabela 5- Grupo e genótipo do RSV dos pacientes infectados em 2002

Nº Paciente	Grupo do RSV	Genótipo
147	A	GA2
1322	B	SAB3
1329	B	SAB3
1370	B	SAB3
1321	B	SAB3
1149	B	SAB3
817	A	GA2
1220	A	GA5
1328	B	SAB3
858	B	SAB1
1248	B	SAB1
1308	B	SAB3

A figura 10 mostra um mapa do momento da infecção pelo RSV em pacientes internados e ambulatoriais, o momento da internação do paciente, o dia da visita do paciente para coleta de amostra, o período em que o vírus ficou sendo diagnosticado e o perfil da cepa aos demais pacientes nos anos de 2001 e 2002. Para a interpretação das descrições a seguir foram utilizadas as figuras 6 e 7 e figuras 8 e 9.

4.4.1 Ano de 2001

O paciente 687 foi um dos primeiros a ser infectado pelo RSV no ano de 2001, no outono, início do mês de maio (figura 10). A cepa do vírus desse paciente não era relacionada filogeneticamente a nenhuma cepa dos pacientes infectados em 2001. Entretanto, essa cepa era intimamente

relacionada à cepa que infectou o paciente 1248 e também foi uma das cepas que abriu a temporada do surto do RSV em 2002. Essas cepas compartilhavam o mesmo genótipo (SAB1) que as cepas isoladas de alguns pacientes do ano de 2001 (TMO4451) e do ano de 2002 (TMO12482 e TMO8582).

Os pacientes 997, 1034 e 1032 estavam infectados com cepas altamente relacionadas filogeneticamente. Essas cepas compartilhavam o mesmo genótipo (GA5) que cepas circulantes na unidade de TCTH no ano de 2002 (TMO1472 e TMO8172) e no ano de 2003 (TMO9763). Um aspecto mais detalhado do momento em que esses pacientes foram diagnosticados com infecção pelo RSV pode ser visto na figura 11.

O paciente 445 estava infectado com uma cepa do RSV que era divergente das demais cepas nos surtos. Entretanto, compartilhava o mesmo genótipo (SAB1) que a cepa TMO6871 isolada do paciente 687 no ano de 2001 e do paciente 1248 cuja cepa foi isolada no ano de 2002.

O paciente 1023 também foi infectado com uma cepa divergente das demais encontradas nos pacientes infectados no ano de 2001, porém a cepa era altamente relacionada à cepa que infectou o paciente 1220 no ano de 2002. Ambas, compartilhavam o mesmo genótipo (GA5) que a cepa TMO11521 (isolada do paciente 1152 no ano de 2001) e a cepa TMO11713 (isolada do paciente 1171 no ano de 2003).

O paciente 1152 foi também infectado com uma cepa divergente em relação às outras cepas encontradas. Essa cepa foi uma das últimas encontradas no surto do RSV no ano de 2001.

No ano de 2001, as cepas do RSV circularam na unidade de TCTH principalmente nos meses de maio e junho, sendo mostrado pelo período de diagnóstico de infecção pelo RSV de todos os pacientes infectados tanto os quais as cepas puderam ser analisadas e os que não puderam ser analisadas (figura 10).

4.4.2 Ano de 2002

O paciente 1248, como já foi citado, foi infectado com uma cepa altamente relacionada filogeneticamente à cepa (TMO6871) presente na unidade de TCTH no ano de 2001. Essa cepa iniciou o surto em 2002, no outono, final do mês de abril (figura 10).

O paciente 147 foi infectado com uma cepa divergente das cepas dos outros pacientes infectados. Entretanto, essa cepa estava relacionada com cepas que circulariam na comunidade no ano de 2003, cepa BR11903 e BR13903 e na própria unidade de TCTH, cepa TMO9763 . A cepa TMO1472 compartilhava o mesmo genótipo (GA2) que as cepas isoladas de outros pacientes da unidade de TCTH.

Os pacientes 1322, 1329, 1370, 1321, 1149, 1308 e 1328 foram infectados com cepas altamente relacionadas pertencentes ao genótipo SAB3. As cepas desses pacientes relacionavam-se com cepas circulantes na comunidade no ano de 2001: BR8601 e BR1501. Um aspecto mais detalhado do momento em que esses pacientes foram diagnosticados com infecção pelo RSV pode ser visto na figura 11.

O paciente 817 foi infectado com uma cepa divergente em relação às cepas circulantes na unidade de TCTH, entretanto, essa cepa apresenta o mesmo padrão de uma cepa circulante na comunidade no ano de 2001 (cepa BR5901) e no ano de 2002 (cepa BR8502). Essa cepa viral surgiu de forma tardia, no mês de agosto e permanecendo até a primavera, no meio de outubro, quando a circulação de RSV na unidade de TCHT encerrou-se no ano de 2002.

O paciente 1220, como já citado, foi infectado com uma altamente relacionada à cepa (cepa TMO10231) presente na unidade de TCTH no ano de 2001. A cepa TMO12201 compartilha o mesmo genótipo (GA5) que cepas isoladas da unidade TCTH no ano de 2001 (TMO10231 e TMO1152) e no ano de 2003 (TMO11713).

O paciente 858 estava infectado com uma cepa do RSV que era divergente das demais cepas nos surtos, entretanto, compartilhava o mesmo genótipo (SAB1) que cepas circulantes na unidade de TCTH no ano de 2001 e uma cepa do ano de 2002 e apresentava alta proximidade com a cepa SA0025.

Um primeiro grupo de infectados foi visto entre o meio de abril ao começo de junho, infelizmente essas cepas não puderam ser analisadas. Um outro grupo de pacientes, cujas cepas também não puderam ser analisadas, apresentou o período de infecção entre agosto e setembro (figura 10).

Figura 6 – Árvore filogenética pelo método de verossimilhança para amostras do grupo A junto às cepas circulantes na comunidade. Modelo de evolução utilizado: GTRG. Valor de verossimilhança: 955,3 .Bootstrap com 500 réplicas. Nota: As cepas que começam com a sigla TMO correspondem aos pacientes receptores de TCTH, o número seguinte à sigla, indica o número do paciente e as amostras que começam com BR são de amostras da comunidade. O dígito final mostra o ano em que as amostras foram encontradas: dígito final 1-ano de 2001, dígito final “2”- ano de 2002 e dígito final “3” –ano de 2003. Os valores em cima dos ramos indicam os valores de “bootstrap”.

Figura 7 – Árvore filogenética pelo método de verossimilhança para amostras do grupo B junto às cepas circulantes na comunidade. Modelo de evolução utilizado: TNRI. Valor de verossimilhança: 717,9. Bootstrap com 500 réplicas. Nota: As cepas que começam com a sigla TMO seguida por número correspondem ao número dos pacientes receptores de TCTH e as amostras que começam com BR são de amostras da comunidade. O dígito final mostra o ano em que as amostras foram encontradas: dígito final 1-ano de 2001, dígito final “2”- ano de 2002 e dígito final “3” –ano de 2003. Os valores em cima dos ramos indicam os valores de “bootstrap”.

Figura 8- Árvore filogenética pelo método de distância utilizando o algoritmo neighbour-joining das amostras do RSV do grupo A junto às seqüências extraídas do Genebank para realização da genotipagem. As cepas que começam com a sigla TMO correspondem aos pacientes receptores de TCTH, número seguinte à sigla indica o número do paciente. O dígito final mostra o ano em que essas amostras foram encontradas: dígito final 1-ano de 2001, dígito final “2”- ano de 2002 e dígito final “3” –ano de 2003. Cepa A2 e Long-cepas padrão do grupo A. As seqüências adquiridas do GeneBank estão incluídas, identificadas pelas iniciais indicando a sua origem: AL- Alabama; NY-New York; MO-Missouri; TX-Texas, CN-Canadá, e SA-África do Sul. Os valores em cima dos ramos indicam os valores de “bootstrap”.

Figura 9 –Árvore filogenética pelo método de distância utilizando o algoritmo neighbour-joining das amostras do RSV do grupo B junto às seqüências extraídas do Genebank para realização da genotipagem. As cepas que começam com a sigla TMO correspondem aos pacientes receptores de TCTH, o número seguinte à sigla indica o número do paciente. O dígito final mostra o ano em que essas amostras foram encontradas: dígito final 1-ano de 2001, dígito final “2”- ano de 2002 e dígito final “3” –ano de 2003. Cepa Ch18537- cepa padrão do grupo B. As seqüências adquiridas do GeneBank estão incluídas, identificadas pelas iniciais indicando a sua origem: Al- Alabama; NY-New York; MO-Missouri; TX-Texas, CN-Canadá, e SA-África do Sul. Os valores em cima dos ramos indicam os valores de “bootstrap”.

2001

2002

Figura 10-Mapa da infecção RSV dentro da unidade de TCTH no HC nos anos de 2001 e 2002

Nota-Os pacientes infectados com quadros de cores iguais indicam infecção com cepa altamente relacionada, exceto os quadros pintados de vermelho (cepas não analisadas). No quadro a risca forte preta delimita na parte de cima as cepas coloridas que foram analisadas e na parte de baixo as cepas em vermelho que não foram analisadas.

V DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

No presente estudo, a infecção pelo RSV ocorreu em receptores de transplante de células-tronco hematopoéticas de ambos os sexos, em diversos períodos pós-transplante, com diferentes tipos de transplante, indicando que o RSV circula amplamente em sua estação. O início da estação do RSV em São Paulo ocorreu em abril em 2001 e em março no ano de 2003. Em 2001 o pico ocorreu em maio e a ocorrência de casos registrou-se até o final do inverno desse ano, concordando dados de regiões com mesmo clima (Raboni *et al.* 2003; Reis, 2006). No ano de 2002, a estação do RSV teve pico no final do outono e inverno e estendeu-se até o mês de outubro, no início da primavera.

Um aspecto que chama atenção nesse grupo de pacientes é a amplitude do tempo pós-transplante em que foi diagnosticada a infecção. O paciente 147, que recebeu um transplante alogênico, teve seu diagnóstico de infecção pelo RSV por volta de 3700 dias pós-transplante. Na unidade de transplante do Hospital das Clínicas de São Paulo, o acompanhamento e vigilância pós-transplante são feitos por longos períodos se o paciente apresentar complicações. Conforme a revisão de Copelan em 2006, a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é a complicação mais importante em transplante alogênico. O paciente com DECH crônica recebe tratamento com drogas imunossupressoras por tempo prolongado, o que aumenta o risco de complicações infecciosas mesmo tardiamente pós-transplante (Copelan, 2006).

De acordo com Khushalani e col. (2001), a infecção pelo RSV num período tardio pós-transplante provavelmente apresenta menor gravidade, entretanto, mesmo nessas situações, é necessária a realização do diagnóstico para introdução de suporte clínico necessário, para que a infecção fique restrita ao trato respiratório superior (Khushalani *et al.*, 2001).

O seqüenciamento de uma parte variável de um gene do RSV tem sido relatado em trabalhos de epidemiologia molecular em comunidades e hospitais. Os genes utilizados são da proteína N e G (Cane, 2001). Neste estudo, mesmo que o genoma completo do vírus não tenha sido seqüenciado, a análise da segunda região variável foi uma ferramenta útil para analisar a circulação de cepas como em vários outros estudos (Peret *et al.*, 2000; Venter *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2005).

Para certificar que todas as amostras analisadas eram fiéis ao seu verdadeiro aspecto, vários cuidados foram tomados e precisam ser ressaltados para a validação desse trabalho e afastar a hipótese de contaminação ocasionando falsos resultados. A reação de “*nested PCR*” aumenta a chance de contaminação das amostras devido à manipulação de material já amplificado. Foram adotadas algumas medidas para evitar a contaminação nessa etapa: a) uso de mais de um controle negativo na reação; b) realização das reações com no máximo 20 amostras e; c) limpeza do fluxo antes da realização da segunda etapa da reação. A maioria das amostras cujas cepas virais eram idênticas neste trabalho não foi processada por PCR no mesmo dia, o que já afasta a possibilidade de contaminação durante o processamento. Muitas amostras foram

seqüenciadas mais de uma vez, muitas amostras foram amplificadas novamente por PCR e outras amostras positivas para RSV do mesmo paciente (extraídas, amplificadas e seqüenciadas em dias diferentes) foram também processadas para comparar com a seqüência da amostra anteriormente seqüenciada.

De acordo com Peret e col, (2000), a presença de cepas com seqüências idênticas na proteína G não necessariamente indica uma origem comum de transmissão. Entretanto, em nosso estudo algumas cepas mostraram-se altamente relacionadas filogeneticamente. Os pacientes apresentavam as mesmas características e freqüentavam o mesmo ambiente periodicamente, é possível que a origem do vírus tenha sido de um paciente e este tenha transmitido o vírus dentro do ambiente fechado, como o hospital.

Muitas amostras neste estudo não puderam ser seqüenciadas. As razões pelas quais não foi possível o seqüenciamento de todas as amostras de RSV identificadas em 2001 e 2002 foram: a) indisponibilidade de algumas amostras para processamento por biologia molecular, visto que o armazenamento da mesma só era possível quando havia material suficiente para processamento para imunofluorescência direta; b) perda do RNA viral presente nas amostras, devido à falha ou tempo de estocagem e; c) a amplificação por PCR gerou produtos com pouco DNA, o que impossibilitou a realização de reação de seqüência com qualidade.

Neste estudo, a maioria das cepas virais analisadas nos anos de 2001 e 2002 era de pacientes que freqüentavam o ambulatório da unidade de

TCTH. Dois “clusters” de cepas altamente relacionadas foram encontrados na análise de verossimilhança, um no ano de 2001 com cepas do grupo A do RSV (TMO9971, TMO 10321 e TMO10341) e outro no ano de 2002, com cepas do grupo B (TMO13702, TMO13222, TMO13292, TMO13212, TMO11492, TMO13282 e TMO3082).

Alguns desses pacientes do ano de 2002 freqüentaram o ambulatório no mesmo dia ou dias após. Esta observação sugere que pode ter havido transmissão dentro do ambulatório, em decorrência da pequena área física do ambulatório que é compartilhada pelos pacientes e da dificuldade de implementação das medidas de controle de RSV nesse setor. Nichols e col. também observaram indício de transmissão cruzada do vírus Parainfluenza 3, também pertencente à família *Paramyxoviridae* dentro do ambulatório no *Fred Hutchinson Cancer Research Center* em Seattle, durante um surto de parainfluenza na instituição. Os autores observaram agrupamento de um genótipo do Parainfluenza 3 nos pacientes ambulatoriais em comparação com os pacientes internados, atendidos no mesmo período (Nichols *et al.*, 2004).

A principal forma de transmissão do RSV, através do contato com superfícies contaminadas com RSV, favorece a transmissão do vírus em hospitais (Raad *et al.*, 1997). Na unidade de internação da Divisão de Transplante de Células-tronco Hematopoéticas não foi detectada infecção em serviços de saúde pelo RSV no período estudado, entretanto, outros autores demonstram a transmissão do vírus dentro da enfermaria (Englund

et al, 1991; Whimbey *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1997; Harrington *et al.* 1992; Mazzulli *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2001).

O paciente 1023 foi diagnosticado com infecção pelo RSV estando hospitalizado, entretanto, o vírus foi diagnosticado dois dias após a internação do paciente, o que de acordo com nossos critérios sugere aquisição na comunidade. Em outro centro de transplante no Brasil, no estado do Paraná, Raboni e col. observaram que a maioria dos pacientes infectados pelo RSV estava internada na enfermaria. Entretanto, o tipo de transmissão não era o objetivo do estudo e não foi possível demonstrar cadeias de transmissão (Raboni *et al.*, 2003).

Medidas de controle de RSV são fácil e rapidamente implementadas em unidades de internação, frente à necessidade de isolamento de contato. No presente estudo, a ausência de infecções em serviço de saúde causadas pelo RSV na enfermaria atesta a efetividade dessas medidas. Entretanto, no ambulatório do transplante onde os pacientes passam várias horas do dia, muitas medidas não podem ser implementadas. Apenas o *cohorting* e o uso de máscara podem ser implementados para os pacientes com diagnóstico de RSV e que necessitavam continuar freqüentando o ambulatório. Por outro lado, os pacientes mantinham contato direto uns com os outros, compartilhando os mesmos objetos e sanitários, tocando superfícies (por exemplo: maçanetas, cadeiras na sala de espera e outros objetos), entre outros. Como este estudo foi retrospectivo, infelizmente, não foi possível advertir a equipe de funcionários sobre o possível tipo de transmissão que estava ocorrendo no ambulatório da unidade de TCTH.

O grupo de pacientes estudado era caracterizado por excretar o RSV por longos períodos. O paciente 997, cuja cepa (TMO9971) era altamente relacionada a outras duas cepas do ano de 2001 (cepas TMO10341 e TMO10321), teve o diagnóstico de infecção pelo RSV em quatro amostras num período de 24 dias, sendo que os 10 últimos dias da excreção ele esteve internado na enfermaria. É possível que o vírus tenha ficado circulando pela unidade de transplante e tenha infectado outros pacientes indiretamente. De acordo com Martino *et al.* (2005), a excreção prolongada do vírus é um fator de risco para aquisição da infecção por vírus respiratórios (Martino *et al.*, 2005). A rápida identificação da infecção pelo RSV e posterior “*cohorting*” são fatores cruciais para o manejo da infecção pelo RSV em unidades de transplante, visto que a excreção prolongada em altos títulos em pacientes imunodeprimidos são fatores que elevam o risco da transmissão do RSV (Garcia *et al.*, 1997).

O RSV foi diagnosticado em quatro amostras do paciente 817, sugerindo um período de excreção de 66 dias. A possibilidade de infecção por outra cepa durante esse período foi afastada pelo seqüenciamento das cepas das amostras no início e final da infecção, tendo-se comprovado tratar-se da mesma cepa. Outros pacientes, cuja excreção viral foi menor, também tiveram mais de uma amostra analisada e também se tratava da mesma cepa. O paciente 1033 do ano de 2003 foi hospitalizado no momento em que foi diagnosticada infecção pelo RSV e manteve-se internado enquanto cinco amostras apresentaram-se positivas (27 dias). Dessa forma,

é possível que o vírus desse paciente tenha ficado circulando na unidade, entretanto, infelizmente, essa cepa não pôde ser seqüenciada e analisada.

Apesar de não sermos capazes de provar a transmissão do vírus de um paciente para outro diretamente através uma rota direta de inoculação dentro da unidade de TCTH, o RSV pode ficar em superfícies por horas, e pode ter infectado os pacientes ou até funcionários do hospital. Por isso, a lavagem freqüente das mãos é de grande valia no controle de infecção do RSV (Hall & Douglas, 1981).

Por outro lado, de acordo com Anaisse e col., em seu trabalho com pequeno número de pacientes, cuja doença de base era mieloma múltiplo, foi encontrado infecção pelo RSV em pacientes assintomáticos. De acordo com os autores, o RSV pode infectar o trato respiratório e não é necessariamente causar doença. Dessa forma, as medidas de controle do RSV dentro de hospitais são ineficazes e acabam sendo de alto custo. Além disso, a maioria dos receptores de transplante freqüenta o ambulatório, podendo adquirir infecção da comunidade (Anaisse *et al.*, 2004).

Há duas grandes limitações neste estudo o quais impossibilitaram o desfecho conclusivo da transmissão do RSV dentro do ambulatório. A primeira é pela pequena quantidade de amostras analisadas fato que impossibilita a visualização de cadeias de transmissão, principalmente em amostras do ano de 2001. Outro aspecto importante é a impossibilidade de colheita de amostras clínicas dos familiares e indisponibilidade de amostra clínica dos funcionários da unidade de TCTH para análise. Os pacientes podem adquirir infecção comunitária em contato com sua família,

especialmente com menores de 12 anos, e podem chegar ao ambulatório já estando infectados (Hall, 2000; Aitken & Jeffries, 2001; Martino *et al.*, 2005).

Embora, tenha sido feita a coleta de secreção respiratória de funcionários com sintomas de infecção respiratória, há possibilidade de infecção assintomática ou oligossintomática, portanto, é possível que o diagnóstico não tenha sido feito em alguns funcionários e que a transmissão tenha ocorrido sem que se possa demonstrá-la (Hall, 2000). A explicação para a falta de sintomas nesse grupo de pessoas pode ser o contato constante com o vírus causando reinfecções freqüentes (Hashem & Hall, 2003). Além disso, as amostras colhidas dos funcionários infectados tiveram seu diagnóstico realizado apenas por imunofluorescência que é uma técnica menos sensível que a RT-PCR e pode subestimar o número de funcionários infectados, visto que em imunocompetentes há menor excreção viral. No estudo que observou infecção pelo RSV em indivíduos saudáveis durante 20 anos, Hashem & Hall, observaram que 96% dos 7% da população total de infectados (funcionários de hospital, estudantes e familiares de crianças) eram funcionários de hospital ou estudantes, provando que essa população de pessoas está mais exposta ao vírus (Hashem & Hall, 2003).

Múltiplas cepas infectaram os pacientes receptores de TCTH nos anos de 2001 e 2002 corroborando os dados de Mazzulli e col., e Englund e col. os quais também observaram a introdução de múltiplas cepas dentro do hospital e sua disseminação (Englund *et al.*, 1991; Mazzulli *et al.*, 1999). Neste estudo, como a maioria dos pacientes não estava internada, eles tinham contato com os vírus da comunidade, fato que pode explicar a

ocorrência da variabilidade de cepas e genótipos dentro da unidade de TCTH.

De acordo com a revisão de Cane em 2001, os grupos A e B do RSV podem co-circular em uma comunidade, embora cepas do grupo A sejam mais dominantes que as cepas do grupo B (Cane, 2001). Surpreendentemente, as cepas analisadas no ano de 2001 eram em sua maioria do grupo A, cujo genótipo predominante era GA2, seguido por GA5, e as cepas circulantes predominantes na comunidade, no Hospital Universitário na cidade de São Paulo nesse ano, eram do grupo B. No ano de 2002 as cepas dos receptores de TCTH eram em sua maioria do grupo B, cujo genótipo predominante era SAB3 e SAB1, e as cepas circulantes predominantes na comunidade também no mesmo hospital eram do grupo A (comunicação oral prof^o Edison Durigon dados não publicados). Esses dados podem sugerir uma vantagem seletiva do vírus, visto que os receptores de TCTH são frágeis imunologicamente, e as cepas dos vírus que infectam esses pacientes não eram as predominantes no surto na comunidade que provavelmente estaria imune a esse genótipo (Cane & Pringle, 1995; Melero *et al.*, 1997). Deve-se salientar que as crianças atendidas no Hospital Universitário, cujas cepas virais foram analisadas neste estudo, representam apenas uma amostragem das cepas da comunidade.

Entretanto, mesmo havendo predomínio de um genótipo, outros genótipos do mesmo grupo ou de outro grupo co-circularam na mesma epidemia. Além disso, duas cepas altamente relacionadas (TMO6871 e

TMO12482, TMO10231 e TMO12202) circularam em anos diferentes. Em seu estudo por nove anos na Coreia, Choi & Lee observaram que as cepas não desaparecem completamente de um ano para outro, embora haja mais de um genótipo circulando em uma epidemia, há sempre predomínio de um e ao longo do tempo um genótipo particular desaparece (Choi & Lee, 2000). A mudança anual nas cepas do RSV deve contribuir para a habilidade do vírus em causar epidemias anuais e continuar causando doença (Peret *et al.*, 1998).

As sete cepas do grupo B que são altamente relacionadas filogeneticamente isoladas dos pacientes, agruparam-se com isolados da comunidade do ano 2001. Entretanto, na análise genotípica, essas cepas ficaram distantes de outras cepas isoladas no mundo. Após, uma análise no BLAST, notou-se que essas cepas eram próximas às cepas circulantes da América do Sul que também pertenciam ao genótipo SAB3. Essas cepas eram próximas das cepas BA3768/99, BA3773/99 isoladas na Argentina no ano de 1999 e SAL/141/99 isolada no Brasil, no ano de 1999 na cidade de Salvador (Moura *et al.*, 2004; Galiano *et al.*, 2005). Em relação às cepas do grupo A, as cepas TMO10231 e TMO12202 que na análise genotípica também estiveram mais distante que as outras cepas, após uma análise no BLAST, eram bem próximas de cepas isoladas no Uruguai, pertencentes ao genótipo GA5: Mon/1/98 isolada no ano de 1998 e Mon/2/01, Mon/3/01 isoladas no ano de 2001 (Arbiza *et al.*, 2005). De acordo com alguns autores, há transferência de cepas entre as comunidades, visto a

proximidade e a facilidade de meios de transporte entre esses países (Peret *et al.*, 2000; Venter *et al.*, 2001).

Por outro lado, na análise genotípica, a cepa TMO8582 isolada no ano 2002, mostrou-se bem próxima à cepa Sa0025 isolada na África do Sul no ano 2000. Esse genótipo SAB1 foi identificado por Venter e col em 2001 através do não agrupamento de algumas seqüências de seu estudo com as seqüências dos genótipos Peret e col (1998) (Venter *et al.*, 2001). Moura e col. observaram que algumas cepas isoladas em Salvador, nordeste do Brasil também eram relacionadas à cepas isoladas em locais distantes, como Moçambique (Moura e *et al.*, 2004). De acordo com Peret e col (1998), devido à estabilidade da proteína G, as cepas dispersam-se amplamente pelo mundo e apresentam uma origem comum podendo ocorrer em mais anos e não necessariamente em uma única epidemia, como o Influenza A (Peret *et al.*, 1998).

É importante ressaltar a necessidade de prevenir a infecção do RSV em hospitais, pois dessa forma, há prevenção de outros vírus respiratórios de importante morbidade também. Jalal e col. diagnosticaram infecção mista por Parainfluenza e RSV em quatro pacientes num total de 22 receptores de TCTH. Em 2001, o estudo das infecções por vírus respiratórios nos receptores de TCTH incluídos no presente trabalho, mostrou co-infecção do RSV em 9 de 68 pacientes (13,2%) nos quais algum vírus respiratório foi identificado (Machado *et al.*, 2003). A prolongada excreção desses vírus e o prolongado tempo de isolamento dos pacientes infectados facilitam a

transmissão desses vírus dentro de enfermarias de hospitais (Jalal *et al.*, 2007).

Por fim, novos conceitos de infecção em serviços de saúde devem ser incorporados, levando em consideração as infecções nosocomiais de etiologia viral. O período de incubação dessas infecções é, em geral, superior a 48 horas, período utilizado para definir infecção de origem nosocomial, e que se refere à infecção de etiologia bacteriana (Peri, 1993).

VI CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

- ✓ Múltiplas cepas do RSV co-circularam na unidade de Transplante de Células-tronco Hematopoéticas (ambulatório e enfermaria) do Hospital das Clínicas de São Paulo entre os anos de 2001 e 2002.
- ✓ No ano de 2001 houve predomínio de cepas do grupo A e em 2002 do grupo B. Os genótipos encontrados no ano de 2001 foram: GA2, GA5 e SAB1 e no ano de 2002: SAB3, SAB1 e GA2.
- ✓ A ocorrência de cepas altamente relacionadas em pacientes ambulatoriais pode indicar uma maior probabilidade de transmissão nessa unidade em relação à enfermaria da Divisão de TCTH.
- ✓ Medidas de controle devem ser também implementadas no ambulatório para prevenir a infecção do RSV em serviços em saúde e outros vírus respiratórios em pacientes ambulatoriais.
- ✓ Algumas cepas do RSV presentes em um determinado ano continuam a circular no ano seguinte.

Anexo A - Aprovação do comitê de ética do presente estudo

HC **HOSPITAL DAS CLÍNICAS**
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 24.03.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **047/05**, intitulado: **"Infecção pelo vírus sincicial respiratório em receptores de TMO. Caracterização da forma de transmissão através do estudo molecular das cepas identificadas de 2001 a 2003"** apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Dra. Clarisse Martins Machado**
Pesquisador(a) Executante: **Dra. Adriana Freire Machado**

CAPPesq, 24 de Março de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br

Anexo B - Aprovação do comitê de ética do projeto "Virose respiratórias em receptores de transplante de medula óssea. Abordagens de diagnóstico e controle".

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
D A
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091
SÃO PAULO – BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12.09.01, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 589/01, intitulado: "Virose respiratórias em receptores de Transplante de Medula Óssea. Abordagens de diagnóstico e controle", apresentado pelo(a) pesquisador(a) Dra. Clarisse Martins Machado, do Departamento de Clínica Médica, bem como o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

CAPPesq, 14 de setembro de 2001.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

**Anexo C – Termo de consentimento livre e esclarecido do projeto
“Virose respiratórias”.**

ANEXO 3 - HOSPITAL DAS CLÍNICAS

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO:..... CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO:..... CIDADE:
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA .Virose Respiratórias em Receptores de TMO.
PESQUISADOR: Clarisse Martins Machado.
CARGO/FUNÇÃO: médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 38331.
UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Transplante de Medula Óssea.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

☐ SEM RISCO ☐	RISCO MÍNIMO ☒	RISCO ☐	MÉDIO ☐
☐ RISCO BAIXO ☐	RISCO MAIOR ☐		

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

Anexo C – Termo de consentimento livre e esclarecido do projeto**“Virose respiratórias” (continuação).****III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE**

Os vírus que causam infecção respiratória na população em geral podem causar doença grave no receptor de transplante, especialmente nos primeiros meses pós TMO. Aqui em São Paulo, os vírus que causam doença respiratória nos transplantados nunca foram estudados e não se sabe quantos pacientes têm infecções graves por vírus respiratórios, quantos poderiam ser tratados, quantos têm boa resposta ao tratamento e qual é a melhor técnica para identificar estes vírus no laboratório. Estas são as principais razões desta pesquisa. O vírus mais importante do grupo de vírus causadores de resfriado e gripe chama-se vírus sincicial respiratório, e pode causar uma pneumonia muito grave. O vírus da gripe também pode causar pneumonia, mas é mais raro que isso aconteça. Para se dizer com certeza que um desses vírus é a causa do resfriado ou da gripe é necessário que se detecte o vírus na secreção do nariz de quem está resfriado. Para colher esta secreção é preciso fazer uma lavagem das duas narinas com soro e o paciente então assoa o nariz em um copo coletor. Este procedimento pode ser um pouco desconfortável, mas não oferece risco para o paciente. O material é encaminhado para o laboratório onde várias técnicas são feitas para se estudar qual é a mais rápida e qual identifica mais corretamente os vírus. Existe tratamento para o vírus da influenza (gripe) e o vírus sincicial. O tratamento da influenza é feito com um medicamento oral (comprimido) que se chama oseltamivir que é dado a cada 12 horas por cinco dias. O tratamento do vírus sincicial é feito por inalação de um medicamento que se chama ribavirina. Esta inalação é prolongada e o paciente recebe a inalação por pelo menos 12 horas seguidas durante sete noites. É feita durante a noite para não interferir com os horários de alimentação e de medicação. Durante a inalação o paciente pode sentir irritação nos olhos e na garganta, tosse, enjôo e talvez apresentar vômitos. Estes sintomas têm tratamento e em geral os pacientes se acostumam com o remédio e os sintomas diminuem a cada dia que passa. O paciente pode sentir ainda falta de ar com chiado no peito. Para evitar este sintoma que é mais desagradável, os pacientes receberão antes uma inalação com broncodilatador para prevenir que isso aconteça. O paciente que é tratado tem risco menor de ter pneumonia e também pára de transmitir o vírus para os outros pacientes do ambulatório ou da enfermaria e assim se evita uma epidemia. A descoberta de uma técnica que seja melhor para diagnóstico dos vírus respiratórios vai ajudar no controle das epidemias em transplantados nos invernos dos anos seguintes.

IV. ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

Estou ciente que terei acesso às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionadas à pesquisa sempre que solicitar. Fui informado que a qualquer momento posso deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo ao meu atendimento na unidade. Estou ciente da confidencialidade, do sigilo e da privacidade das informações obtidas. Em caso de algum dano à minha saúde em decorrência da pesquisa, está assegurada minha assistência no HCFMUSP.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dra. Clarisse Martins Machado
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 2º andar
05403-000 São Paulo SP Tel: 3066 7020

**Anexo C – Termo de consentimento livre e esclarecido do projeto
“Virose respiratórias” (continuação).**

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2002.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo IV - Foto do salão de medicação do ambulatório da Divisão de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams R, Christenson J, Petersen F, Beatty P. Pre-emptive use of aerosolized ribavirin in the treatment of asymptomatic pediatric marrow transplant patients testing positive for RSV. **Bone Marrow Transplant**. 1999; 24(6):661-4.

Aitken C, Jeffries DJ. Nosocomial spread of viral disease. **Clin Microbiol Rev**. 2001; 14(3):528-46.

Anaissie EJ, Mahfouz TH, Aslan T, Pouli A, Desikan R, Fassas A, Barlogie B. The natural history of respiratory syncytial virus infection in cancer and transplant patients: implications for management. **Blood**. 2004; 103(5):1611-7.

Anderson, L. J., Hieirholzer, J. C., Tson, C., Hendry, R. M., Fernie, B. N., Stone, Y. & McIntosh, K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **Journal of Infectious Diseases** 1985; 151, 626-633.

Arbiza J, Delfraro A, Frabasile Sa. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001 A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2005; 100(3): 221-229.

Atreya PL, Peeples ME, Collins PL. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. **J Virol**. 1998 72(2):1452-61.

Blanc A, Delfraro A, Frabasile S, Arbiza J. Genotypes of respiratory syncytial virus group B identified in Uruguay. **Arch Virol**. 2005; 150(3):603-9.

Boeckh M, Englund J, Li Y, Miller C, Cross A, Fernandez H, Kuypers J, Kim H, Gnann J, Whitley R; NIAID Collaborative Antiviral Study Group. Randomized controlled multicenter trial of aerosolized ribavirin for respiratory syncytial virus upper respiratory tract infection in hematopoietic cell transplant recipients. **Clin Infect Dis**. 2007; 44(2):245-9

Boivin G, Cote S, Dery P, De Serres G, Bergeron MG. Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. **J Clin Microbiol.** 2004; 42(1):45-51.

Borg I, Rohde G, Loseke S, Bittscheidt J, Schultze-Werninghaus G, Stephan V, Bufe A. Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary diseases. **Eur Respir J.** 2003; 21(6):944-51.

Bowden RA. Respiratory virus infections after marrow transplant: the Fred Hutchinson Cancer Research Center experience. **Am J Med.** 1997; 102(3A):27-30;

Candeias JA. Isolation of the respiratory syncytial virus from children with acute respiratory infections. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 1967; 9(1):27-30.

Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. **J Gen Virol.** 1991; 72 (Pt 9):2091-6.

Cane PA, Pringle CR. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. **J Virol.** 1995; 69(5):2918-25.

Cane PA. Analysis of linear epitopes recognized by the primary human antibody response to a variable region of the attachment (G) protein of respiratory syncytial virus. **J Med Virol.** 1997; 51(4):297-304.

Cane PA, Weber M, Sanneh M, Dackour R, Pringle CR, Whittle H. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in The Gambia. **Epidemiol Infect.** 1999; 122(1):155-60.

Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. **Rev Med Virol.** 2001;11(2):103-16.

Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. **Am J Hyg.** 1957; 66(3):281-90.

Cheng X, Park H, Zhou H, Jin H. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. **J Virol.** 2005 ;79(22):13943-52.

Chidgey SM, Broadley KJ. Respiratory syncytial virus infections: characteristics and treatment. **J Pharm Pharmacol.** 2005 ;57(11):1371-81.

Choi EH, Lee HJ. Genetic diversity and molecular epidemiology of the G protein of subgroups A and B of respiratory syncytial viruses isolated over 9 consecutive epidemics in Korea. **J Infect Dis.** 2000; 181(5):1547-56.

Cintra OA, Owa MA, Machado AA, Cervi MC, Figueiredo LT, Rocha GM, Siqueira MM, Arruda E. Occurrence and severity of infections caused by subgroup A and B respiratory syncytial virus in children in southeast Brazil. **J Med Virol.** 2001; 65(2):408-12.

Coates HV, Alling DW, Chanock RM. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test. **Am J Epidemiol.** 1966; 83(2):299-313.

Coggins WB, Lefkowitz EJ, Sullender WM. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. **J Clin Microbiol.** 1998; 36(12):3552-7.

Collins CL, Pollard AJ. Respiratory syncytial virus infections in children and adults. **J Infect.** 2002; 45(1):10-7.

Collins P L, Wertz G W. cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1983;80:3208–3212.

Collins, P. L., M. G. Hill, and P. R. Johnson. The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. **J. Gen. Virol.** 1990; 71:3015-3020.

Collins, P. L., M. G. Hill, J. Cristina, and H. Grosfeld. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1996; 93:81-85.

Collins, P. L. & Mottet, G.. Oligomerization and posttranslational processing of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus. Altered O-glycosylation in the presence of brefeldin A. **Journal of General Virology.** 1992; 73, 849-863.

Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. Respiratory syncytial virus. In: Knipe DM, Howley, PM, editors. **Fields Virology** (book on CD-ROM), 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001. p. 1443–1485.

Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. **N Engl J Med.** 2006; 354(17):1813-26.

Couch RB, Englund JA, Whimbey E. Respiratory viral infections in immunocompetent and immunocompromised persons. **Am J Med.** 1997;102(3A):2-9.

Cristina J, Moya A, Arbiza J, Russi J, Hortal M, Albo C, Garcia-Barreno B, Garcia O, Melero JA, Portela A. Evolution of the G and P genes of human respiratory syncytial virus (subgroup A) studied by the RNase A mismatch cleavage method. **Virology.** 1991; 184(1):210-8.

DeVincenzo JP, Hirsch RL, Fuentes RJ, Top FH Jr. Respiratory syncytial virus immune globulin treatment of lower respiratory tract infection in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation - a compassionate use experience. **Bone Marrow Transplant.** 2000; 25(2):161-5.

DeVincenzo JP. Natural infection of infants with respiratory syncytial virus subgroups A and B: a study of frequency, disease severity, and viral load. **Pediatr Res.** 2004; 56(6):914-7.

Dewhurst-Maridor G, Simonet V, Bornand JE, Nicod LP, Pache JC. Development of a quantitative TaqMan RT-PCR for respiratory syncytial virus. **J Virol Methods.** 2004; 120(1):41-9.

Domachowske JB, Rosenberg HF. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. **Clin Microbiol Rev.** 1999 Apr; 12(2):298-309.

Dowell SF, Anderson LJ, Gary HE Jr, Erdman DD, Plouffe JF, File TM Jr, Marston BJ, Breiman RF. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. **J Infect Dis.** 1996; 174(3):456-62.

Dudas RA, Karron RA. Respiratory syncytial virus vaccines. **Clin Microbiol Rev.** 1998; 11(3):430-9

Englund JA, Anderson LJ, Rhame FS. Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults. **J Clin Microbiol.** 1991; 29(1):115-9.

Englund JA, Piedra PA, Jewell A, Patel K, Baxter BB, Whimbey E. Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections in immunocompromised adults. **J Clin Microbiol.** 1996; 34(7):1649-53.

Falsey AR, Cunningham CK, Barker WH, Kouides RW, Yuen JB, Menegus M, Weiner LB, Bonville CA, Betts RF. Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. **J Infect Dis.** 1995; 172(2):389-94.

Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. **Clin Microbiol Rev.** 2000; 13(3):371-84.

Fletcher JN, Smyth RL, Thomas HM, Ashby D, Hart CA. Respiratory syncytial virus genotypes and disease severity among children in hospital. **Arch Dis Child.** 1997; 77(6):508-11.

Galiano MC, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). **J Clin Microbiol.** 2005; 43(5):2266-73

Garcia R, Raad I, Abi-Said D, Bodey G, Champlin R, Tarrand J, Hill LA, Umphrey J, Neumann J, Englund J, Whimbey E. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: prevention and control in bone marrow transplant patients. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 1997; 18(6):412-6.

Garcia-Barreno B, Palomo C, Penas C, Delgado T, Perez-Brena P, Melero JA. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. **J Virol.** 1989; 63(2):925-32.

Garcia O, Martin M, Dopazo J, Arbiza J, Frabasile S, Russi J, Hortal M, Perez-Brena P, Martinez I, Garcia-Barreno B, et al. Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. **J Virol.** 1994; 68(9):5448-59.

Girard MP, Cherian T, Pervikov Y, Kieny MP, Hacking D, Hull J A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. **Vaccine.** 2005 30; 23(50):5708-24.

Graham BS, Rutigliano JA, Johnson TR. Respiratory syncytial virus immunobiology and pathogenesis. **Virology.** 2002; 297(1):1-7.

Ghosh S, Champlin RE, Englund J, Giralt SA, Rolston K, Raad I, Jacobson K, Neumann J, Ippoliti C, Mallik S, Whimbey E. Respiratory syncytial virus upper respiratory tract illnesses in adult blood and marrow transplant recipients: combination therapy with aerosolized ribavirin and intravenous immunoglobulin. **Bone Marrow Transplant.** 2000; 25(7):751-5.

Hacking D, Hull J. Respiratory syncytial virus--viral biology and the host response. **J Infect.** 2002; 45(1):18-24.

Hall CB, Douglas RG Jr. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. **J Pediatr.** 1981; 99(1):100-3.

Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. **J Infect Dis.** 1991; 163(4):693-8.

Hall CB. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the "Cold War" has not ended. **Clin Infect Dis.** 2000; 31(2):590-6.

Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. **N Engl J Med.** 2001; 344(25):1917-28.

Hashem M, Hall CB. Respiratory syncytial virus in healthy adults: the cost of a cold. **J Clin Virol.** 2003; 27(1):14-21.

Harrington RD, Hooton TM, Hackman RC, Storch GA, Osborne B, Gleaves CA, Benson A, Meyers JD. An outbreak of respiratory syncytial virus in a bone marrow transplant center. **J Infect Dis.** 1992; 165(6):987-93.

Harris J, Werling D. Binding and entry of respiratory syncytial virus into host cells and initiation of the innate immune response. **Cell Microbiol.** 2003; 5(10):671-80.

Henderson FW, Collier AM, Clyde WA Jr, Denny FW. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. **N Engl J Med.** 1979; 300(10):530-4

Hendricks DA, McIntosh K, Patterson JL. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. **J Virol.** 1988; 62(7):2228-33.

Hertz MI, Englund JA, Snover D, Bitterman PB, McGlave PB. Respiratory syncytial virus-induced acute lung injury in adult patients with bone marrow transplants: a

clinical approach and review of the literature. **Medicine (Baltimore)**. 1989; 68(5):269-81.

Hu A, Colella M, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. **J Clin Microbiol**. 2003; 41(1):149-54.

Jalal H, Bibby DF, Bennett J, Sampson RE, Brink NS, Mackinnon S, Tedder RS, Ward KN. Molecular investigations of an outbreak of parainfluenza virus type 3 and respiratory syncytial virus infections in a hematology unit. **J Clin Microbiol**. 2007; 45(6):1690-6.

Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1987; 84(16):5625-9.

Kawasaki Y, Hosoya M, Katayose M, Suzuki H. Role of serum neutralizing antibody in reinfection of respiratory syncytial virus. **Pediatr Int**. 2004; 46(2):126-9.

Kellogg JA. Culture vs direct antigen assays for detection of microbial pathogens from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. **Arch Pathol Lab Med**. 1991; 115(5):451-8.

Kingsbury DW 1990. Paramyxoviridae and their replication..In: Knipe DM, Howley, PM, editors. **Fields Virology**, 2th ed. New York, PA. Raven Press; 1990. p. 945-962

Khushalani NI; Bernstein ZP, Bernstein SH, Czuczman MS, Segal BH, McCarthy PL Jr. Respiratory syncytial virus infection in the late bone marrow transplant period: report of three cases and review. **Bone Marrow Transplant**. 2001; 27(10):1071-3.

Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Tsutsumi H. Genetic variability and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus subgroup a strains in Japan determined by heteroduplex mobility assay. **J Clin Microbiol**. 2004; 42(5):2048-53.

Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. **J Gen Virol**. 1987; 68 (Pt 9):2521-4.

Ljungman P, Gleaves CA, Meyers JD. Respiratory virus infection in immunocompromised patients. **Bone Marrow Transplant**. 1989; 4(1):35-40.

Ljungman P. Respiratory virus infections in stem cell transplant patients: the European experience. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2001;7 Suppl:5S-7S.

Looney RJ, Falsey AR, Walsh E, Campbell D. Effect of aging on cytokine production in response to respiratory syncytial virus infection. **J Infect Dis**. 2002; 185(5):682-5

Lum LG. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. **Blood**. 1987; 69(2):369-80.

Macartney KK, Gorelick MH, Manning ML, Hodinka RL, Bell LM. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the cost-effectiveness and cost-benefit of infection control. **Pediatrics**. 2000; 106(3):520-6.

Machado CM, Boas LS, Mendes AV, Santos MF, da Rocha IF, Sturaro D, Dulley FL, Pannuti CS. Low mortality rates related to respiratory virus infections after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**. 2003; 31(8):695-700.

Marangoni & Santos. Infecção hospitalar e seu controle. In: Coura JR. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabaa Koogan; 2005. p. 435-459.

Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. **J Infect Dis**. 2002; 186(6):839-42.

Martinez I, Dopazo J, Melero JA. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. **J Gen Virol**. 1997; 78 (Pt 10):2419-29.

Martinez I, Valdes O, Delfraro A, Arbiza J, Russi J, Melero JA. Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B: the use of alternative termination codons and lineage diversification. **J Gen Virol.** 1999; 80 (Pt 1):125-30.

Martinez I, Melero JA. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. **J Gen Virol.** 2000; 81(Pt 11):2715-22.

Martino R, Porras RP, Rabella N, Williams JV, Ramila E, Margall N, Labeaga R, Crowe JE Jr, Coll P, Sierra J. Prospective study of the incidence, clinical features, and outcome of symptomatic upper and lower respiratory tract infections by respiratory viruses in adult recipients of hematopoietic stem cell transplants for hematologic malignancies. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2005; 11(10):781-96.

Mason SW, Aberg E, Lawetz C, DeLong R, Whitehead P, Liuzzi M. Interaction between human respiratory syncytial virus (RSV) M2-1 and P proteins is required for reconstitution of M2-1-dependent RSV minigenome activity. **J Virol.** 2003; 77(19):10670-6.

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.** 1999; 180(5):1686-9.

McCarthy AJ, Kingman HM, Kelly C, Taylor GS, Caul EO, Grier D, Moppett J, Foot AB, Cornish JM, Oakhill A, Steward CG, Pamphilon DH, Marks DI. The outcome of 26 patients with respiratory syncytial virus infection following allogeneic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.** 1999; 24(12):1315-22.

McColl MD, Corser RB, Bremner J, Chopra R. Respiratory syncytial virus infection in adult BMT recipients: effective therapy with short duration nebulised ribavirin. **Bone Marrow Transplant.** 1998; 21(4):423-5.

McDonald TP, Jeffree CE, Li P, Rixon HW, Brown G, Aitken JD, MacLellan K, Sugrue RJ. Evidence that maturation of the N-linked glycans of the respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins is required for virus-mediated cell fusion: The effect of alpha-mannosidase inhibitors on RSV infectivity. **Virology**. 2006; 350(2):289-301.

Melero JA, Garcia-Barreno B, Martinez I, Pringle CR, Cane PA. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein..**J Gen Virol**. 1997; 78 (Pt 10):2411-8.

Morris JA, Blount RE Jr, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proc Soc Exp Biol Med**. 1956; 92(3):544-9.

Moura FE, Blanc A, Frabasile S, Delfraro A, de Sierra MJ, Tome L, Ramos EA, Siqueira MM, Arbiza J. Genetic diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of northeastern Brazil. **J Med Virol**. 2004; 74(1):156-60.

Moura FE, Nunes IF, Silva GB Jr, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus infections in northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. **Am J Trop Med Hyg**. 2006; 74(1):165-7.

Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **J Gen Virol**. 1985 Oct;66 (Pt 10):2111-24.

Nagai K, Kamasaki H, Kuroiwa Y, Okita L, Tsutsumi H. Nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus subgroup B variants with the 60 nucleotides-duplicated G protein gene. **J Med Virol**. 2004; 74(1):161-5.

Nichols WG, Erdman DD, Han A, Zukerman C, Corey L, Boeckh M. Prolonged outbreak of human parainfluenza virus 3 infection in a stem cell transplant outpatient department: insights from molecular epidemiologic analysis. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2004; 10(1):58-64.

Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. **Methods**. 2001; 25(4):419-29.

Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. **Paediatr Respir Rev**. 2004;5 Suppl A:S119-26.

Ottolini MG, Hemming VG. Prevention and treatment recommendations for respiratory syncytial virus infection. Background and clinical experience 40 years after discovery. **Drugs**. 1997; 54(6):867-84.

Peck AJ, Corey L, Boeckh M. Pretransplantation respiratory syncytial virus infection: impact of a strategy to delay transplantation. **Clin Infect Dis**. 2004; 39(5):673-80.

Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. **J Gen Virol**. 1998; 79 (Pt 9):2221-9.

Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, Tsou C, Anderson LJ. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. **J Infect Dis**. 2000; 181(6):1891-6

Peri TM. Surveillance, reporting and the use of computers. In: Wenzel RP, editor. **Prevention and control of nosocomial infections**, 2nd ed. Baltimore, MA, Williams and Wilkins; 1993.p.139-176.

Raad I, Abbas J, Whimbey E. Infection control of nosocomial respiratory viral disease in the immunocompromised host. **Am J Med**. 1997 17; 102(3A):48-52

Raboni SM, Nogueira MB, Tsuchiya LR, Takahashi GA, Pereira LA, Pasquini R, Siqueira MM. Respiratory tract viral infections in bone marrow transplant patients. **Transplantation**. 2003 15;76(1):142-6.

Rafiefard F, Johansson B, Tecle T, Orvell C. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus (RSV) of group A in Stockholm, Sweden, between 1965 and 2003. **Virus Res**. 2004; 105(2):137-45.

Reis, AD. Incidência de doença de vias aéreas pelo vírus sincicial respiratório humano em coorte de recém nascidos do município de São Paulo: comparação de técnicas diagnósticas e caracterização molecular (tese). São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2006.

Roberts SR, Lichtenstein D, Ball LA, Wertz GW. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. **J Virol**. 1994; 68(7):4538-46.

Ross DW. The immune system following bone marrow transplantation. **Arch Pathol Lab Med**. 1996; 120(9):885-6.

Saitou and Nei. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**. 1987; 4(4):406-25.

Sato M, Saito R, Sakai T, Sano Y, Nishikawa M, Sasaki A, Shobugawa Y, Gejyo F, Suzuki H. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. **J Clin Microbiol**. 2005; 43(1):36-40.

Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, Nokes DJ, Medley GF, Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. **J Med Virol**. 2004; 74(2):344-54.

Silva AR, Park M, Costa SF, Machado CM. Respiratory virus infections in intensive care unit patients in São Paulo, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. 2004; 8 (Presented at 13th International Symposium of Infections in the Immunocompromised Host; 2004 June; Granada, Spain. Abstracts)

Small TN, Casson A, Malak SF, Boulad F, Kiehn TE, Stiles J, Ushay HM, Sepkowitz KA. Respiratory syncytial virus infection following hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**. 2002; 29(4):321-7.

Srinivasakumar N, Ogra PL, Flanagan TD. Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. **J Virol.** 1991; 65(8):4063-9.

Stensballe LG, Devasundaram JK, Simoes EA. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. **Pediatr Infect Dis J.** 2003; 22(2 Suppl):S21-32

Storch GA, Hall CB, Anderson LJ, Park CS, Dohner DE. Antigenic and nucleic acid analysis of nosocomial isolates of respiratory syncytial virus. **J Infect Dis.** 1993; 167(3):562-6.

Straliotto SM, Nestor SM, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2001; 96(2):155-8.

Sullender WM, Mufson MA, Anderson LJ, Wertz GW. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. **J Virol.** 1991; 65(10):5425-34.

Sullender WM, Sun L, Anderson LJ. Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. **J Clin Microbiol.** 1993; 31(5):1224-31

Sullender WM, Mufson MA, Prince GA, Anderson LJ, Wertz GW. Antigenic and genetic diversity among the attachment proteins of group A respiratory syncytial viruses that have caused repeat infections in children. **J Infect Dis.** 1998; 178(4):925-32.

Sullivan KM, Dykewicz CA, Longworth DL, Boeckh M, Baden LR, Rubin RH, Sepkowitz KA; Centers for Disease Control and Prevention; Infectious Diseases Society of America; American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines and beyond. Preventing opportunistic infections after hematopoietic stem cell transplantation: the Centers for Disease Control and Prevention, Infectious Diseases Society of America, and American Society for Blood

and Marrow Transplantation Practice Guidelines and beyond. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. 2001; 392-421.

Swofford, D. L. PAUPI* **Phylogenetic Analysis Using Parssimony (*and others methods)**. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, 1998.

Tantivanich S, Suphanaranonda K, Balachanda K, Anderson R. Detection of respiratory syncytial virus from clinical specimens: comparison between reverse transcription polymerase chain reaction and tissue culture. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. 1995; 26(4): 684-8.

Taylor GS, Vipond IB, Caul EO. Molecular epidemiology of outbreak of respiratory syncytial virus within bone marrow transplantation unit. **J Clin Microbiol**. 2001; 39(2):801-3.

The NCBI Taxonomy Homepage (on line). National Center of Biotechnology Information. 2006. (accessed in 2006, August). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/index.cgi>

The Universal Virus database of the International Comittee on Taxonomy of Viruses (on line). International Comittee on Taxonomy of Viruses. 2002. (accessed in 2006, August) Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 1997; 25:4876-4882.

Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, Melero JA. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. **J Virol**. 2006; 80(2):975-84.

Tristram DA, Welliver RC 1995. Respiratory syncytial virus. In EH Lennette, DA Lennette, ET Lennette (eds), **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections**, 7th ed., American Public Health Association, Washington, p. 539-552.

van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nat Med**. 2001; 7(6):719-24.

van Elden LJ, van Kraaij MG, Nijhuis M, Hendriksen KA, Dekker AW, Rozenberg-Arska M, van Loon AM. 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**. 2002 15; 34(2):177-83.

van Elden LJ, van Loon AM, van der Beek A, Hendriksen KA, Hoepelman AI, van Kraaij MG, Schipper P, Nijhuis M. Applicability of a real-time quantitative PCR assay for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. **J Clin Microbiol**. 2003; 41(9):4378-81.

Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. **J Gen Virol**. 2001; 82(Pt 9):2117-24.

Venter M, Collinson M, Schoub BD. Molecular epidemiological analysis of community circulating respiratory syncytial virus in rural South Africa: Comparison of viruses and genotypes responsible for different disease manifestations. **J Med Virol**. 2002; 68(3):452-61.

Vieira SE, Stewien KE, Queiroz DA, Durigon EL, Torok TJ, Anderson LJ, Miyao CR, Hein N, Botosso VF, Pahl MM, Gilio AE, Ejzenberg B, Okay Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in Sao Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2001; 43(3):125-31.

Walsh EE, Hruska J. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. **J Virol**. 1983; 47(1):171-7.

Walsh EE, Brandriss MW, Schlesinger JJ..Immunological differences between the envelope glycoproteins of two strains of human respiratory syncytial virus. **J Gen Virol.** 1987; 68 (Pt 8):2169-76.

Waris M, White LJ. Seasonality of respiratory syncytial virus infection. **Clin Infect Dis.** 2006; 43(4):541.

Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. **Trop Med Int Health.** 1998; 3(4):268-80.

Wertz GW, Moudy RM. Antigenic and genetic variation in human respiratory syncytial virus. **Pediatr Infect Dis J.** 2004; 23(1 Suppl):S19-24.

Whimbey E, Couch RB, Englund JA, Andreeff M, Goodrich JM, Raad II, Lewis V, Mirza N, Luna MA, Baxter B, et al. Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adult patients with leukemia. **Clin Infect Dis.** 1995 ; 21(2):376-9.

Whimbey E, Champlin RE, Couch RB, Englund JA, Goodrich JM, Raad I, Przepiorka D, Lewis VA, Mirza N, Yousuf H, Tarrand JJ, Bodey GP. Community respiratory virus infections among hospitalized adult bone marrow transplant recipients. **Clin Infect Dis.** 1996; 22(5):778-82.

Whimbey E, Englund JA, Couch RB. Community respiratory virus infections in immunocompromised patients with cancer. **Am J Med.** 1997; 102(3A):10-8.

APÊNDICE

APÊNDICE

Código de acesso do GenBank de cepas utilizadas na genotipagem

Cepas do grupo A

Genótipo	Cepa	Código
GA1	CH34	AF65257
	NY108	AF233917
	MO48	AF232914
	AL19471-5	AF233902
GA2	AL 19376-1	AF233900
	CH57	AF065258
	CH28	AF065256
	TX69564	AF233923
	MO55	AF233915
GA3	TX68481	AF233920
	TX68532	AF233921
	MO16	AF233913
	MO13	AF233911
	CN395	AF233905
GA4	CH09	AF065254
GA5	CN3114	AF233908
	AL19556-3	AF233903
	CH17	AF065255
	TX69343	AF233922
	NY103	AF233016
	TX67951	AF233919
	MO15	AF233912
	CN2708	AF233906
GA6	NY20	AF233918
	AL19452-2	AF233901
GA7	MO02	AF233910
	CN2851	CN2851
	CN1973	AF233904
SAV1	SA97D669	AF348801.1
	SA98D707	AF348810.1

Cepas do grupo B

Genótipo	Cepa	Código
GB1	CH10b	AF065251
GB2	CH939b	AF0652251
GB3	NY97	AF233932
	MO53	AF233930
	MO35	AF233929
	CN521	AF233927
	AL19794-1	AF233925
	TX69208	AF233933
GB4	AL197334-4	AF233924
	NY01	AF233931
	CN1839	AF233926
	MO30	AF233928
SAB1	SA0025	AF348825
	SA98D1656	AF348826
SAB2	SA99V1325	AF3488260
	SA99V800	AF3488261
SAB3	SA0028	AF348812

A2 e Long- Cepas padrão do grupo A

Ch18537- Cepa padrão do grupo B