ALEXANDA DIAS REIS

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

Área de concentração:

Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti

SÃO PAULO

2006

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti, profissional íntegro e competente, pela confiança, pelas muitas oportunidades geradas e pelos ensinamentos inestimáveis.

À Dra. Clarisse Martins Machado, por suas correções e sugestões precisas em todas as etapas deste trabalho.

À Maria Cristina D. S. Fink, pela valiosa ajuda na realização das reações de imunofluorescência e, pela disposição em sempre ajudar da melhor maneira possível.

Ao José de Paula Paz Jr., grande amigo, pelo auxílio no trabalho com cultura de células, pela sua invejável dedicação e interesse pelo assunto.

Ao Renato dos Reis Oliveira, pela ajuda com o isolamento viral, pela amizade e companheirismo.

À Adriana Freire Machado, carinhosamente Drica, pelo auxílio com o teste de sensibilidade, pelas deliciosas conversas e camaradagem nos momentos difíceis.

À Adriana Tateno, por estes 13 anos de convívio, por sua colaboração na execução das reações de seqüenciamento e sua “eterna” disponibilidade (inclusive aos sábados e feriados).

À Michelle de Marchi, pela colaboração e disposição na triagem das amostras.

À Laura M. Sumita, que com muita competência realizou a clonagem do vírus, pela amizade, companheirismo e caráter que sempre demonstrou.

À Jussara C. S. P. de Moraes, pela ajuda com as referências bibliográficas, mas principalmente pela ajuda e camaradagem nas horas difíceis com minhas filhas, pela disposição contínua.

Aos Drs. Luis Vicente R. F. da Silva Filho e José Eduardo Levi, pelas valiosas sugestões e correções fundamentais na elaboração e execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aluísio Augusto C. Segurado, profissional brilhante, pelas sugestões valiosas na qualificação deste trabalho.

À Profa. Dra. Vanda Akico Ueda, pelo apoio e orientação na trajetória de minha carreira científica.

À Dra. Maria Aparecida Basile, pelo seu entusiasmo à ciência da educação e incentivo aos pós-graduandos no preparo para a carreira científica.

À Lucy Villas Bôas, por sua competência, profissionalismo e amizade, que muito tem contribuído para o meu crescimento profissional e acima de tudo pessoal, pela disposição eterna de ajudar os iniciantes na carreira científica.

À Profa. Dra. Regina Cardoso e a todo grupo Chiado pela colaboração para a realização deste trabalho.

À Rosimeire Moraes Ribeiro e Roseli Antoni Santo, secretárias da pós-graduação, que além de prestativas sempre demonstraram apoio e carinho.

A todos os meus amigos do Laboratório de Virologia do IMT da USP pelo tempo agradável de convívio e aprendizado: Alessandra, Anderson, Carla, Cícero, Cynthia, Daisy, Daniel, Daniela, Débora, Eduardo, Elaine, Érica, Glória, Jaila, Luciano, Maria, Maria Carolina, Marli, Nadily, Silvana, Silvia, Synara, Sonia, Tânia, Vera, Viviane, Wilton.

Aos novos colegas do Centro de Genoma pelo apoio constate.

A todas as crianças que participaram deste trabalho e foram os motivos de sua realização.

Ao Robson, pelo apoio irrestrito e dedicação com as meninas (Carol e Duda) para a realização deste trabalho.

Aos meus sobrinhos, Raphaela, Diogo e Anna Júlia: ser criança é manter a pureza e a inocência dentro de nós.

A minha família, por seus estímulos e por acreditarem em mim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pelo auxílio financeiro processo nº 2002/08465-8) e CAPES (bolsa).

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – HISTÓRICO.....	2
1.2 - ASPECTOS VIROLÓGICOS.....	3
1.2.1 – Classificação.....	3
1.2.2 – estrutura	4
1.2.3 – estrutura Genômica	6
1.3 – CICLO REPLICATIVO DO VÍRUS.....	7
1.4 – CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E MOLECULAR.....	9
1.5 – ASPECTOS CLÍNICOS.....	12
1.6 – EPIDEMIOLOGIA.....	17
1.7 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	24
2 – OBJETIVOS.....	34
3 – CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	36
3.1 – DESENHO DO ESTUDO.....	37
3.2 - CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	37
3.3 - ASPECTOS ÉTICOS.....	38
3.4 – COLETA DE DADOS	39
3.5 – ENTRADA E ANÁLISE DOS DADOS.....	40

3.6 – MÉTODOS LABORATORIAIS	40
3.6.1- Coleta das Amostras.....	40
3.6.2 – Processamento das Amostras.....	41
3.6.2.1 – Linhagens Celulares.....	42
3.6.2.2 – Isolamento Clássico – Tubos.....	42
3.6.2.3 – Isolamento Clássico – Placas.....	43
3.6.2.4 – Imunofluorescência Direta.....	43
3.6.2.5 – Reação em Cadeia por Polimerase (RT-PCR)	45
3.6.2.6 – Sensibilidade do Teste (RT-PCR).....	48
3.6.2.7 – Purificação dos Produtos Amplificados.....	49
3.6.2.8 – Quantificação e Diluição do produto Purificado.....	49
3.6.2.9 – Sequenciamento Parcial do gene G do VSRH.....	50
3.6.2.10 – Processamento e Alinhamento das Sequências do gene G do VSRH.....	51
3.6.2.11 – Análise Genotípica.....	51
3.6.2.12 – Análise da Variabilidade de Nucleotídeos e Intragenótipos.....	52
4 – RESULTADOS.....	53
4.1- INCIDÊNCIA.....	54
4.2 – COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO DO VSRH.....	57

4.2.1 – Diagnóstico do VSRH por Isolamento em Cultura de Células.....	59
4.3 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	63
4.3.1 – Análise da variabilidade de nucleotídeos intragenótipos....	64
4.4 - ANÁLISE GENOTÍPICA.....	64
5 – DISCUSSÃO.....	66
6 – CONCLUSÕES.....	80
7 – ANEXOS.....	83
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
9 – APÊNDICE.....	121

RESUMO

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 e caracterização molecular.

No presente trabalho, avaliou-se uma coorte de recém-nascidos provenientes de três hospitais públicos do município de São Paulo com o objetivo de determinar a incidência de doença de vias aéreas pelo vírus sincicial respiratório humano (VSRH), avaliar diferentes métodos para detectar o vírus em secreção respiratória e analisar geneticamente as cepas circulantes nesta população no período do estudo.

No período de dezembro de 2002 a abril de 2005 foram recrutados 270 recém-nascidos saudáveis, que preenchiam os critérios de inclusão do estudo. O tempo médio de acompanhamento foi de 13,5 meses. Destes 270 recém-nascidos, 173 apresentaram, pelo menos, episódio de doença de vias aéreas, tendo 92 deles apresentado um único episódio documentado de doença respiratória e 81 dois ou mais episódios. No total, foram processados 316 amostras, e o VSRH foi identificado em 36/316 (11,4%). A taxa de incidência de doença pelo VSRH foi de 9,84/1000 crianças-mês.

A reação em cadeia por polimerase (PCR) foi a técnica mais sensível, tendo mostrado resultado positivo em 35/316 (11,1%) amostras, seguida pela imunofluorescência (25/316, 7,9%) e por último o isolamento viral (20/316, 6,7%) ($p < 0,0001$). Das 35 produtos da PCR, 29 puderam ser seqüenciados e submetidos ao BLAST, para afastar a possibilidade de inespecificidade das bandas

encontradas no gel de agarose, e em todas foi confirmado tratar-se de seqüências do VSRH. As seqüências foram em seguida alinhadas pelo método de *Clustal W Method* (*Expert Analysis Software – DNASTar, Inc. EUA para PC*). Observou-se que 23 das 29 seqüências não eram 100% similares. Contudo foram identificados três conjuntos de seqüências iguais (um conjunto com quatro amostras, outro com três e outro com duas), mas nenhuma das amostras com 100% de similaridade foram processadas para a PCR no mesmo dia. Desta forma, ainda que a possibilidade de contaminação intralaboratorial não possa ser totalmente descartada, os dados do seqüenciamento tornam esta possibilidade bastante remota.

O isolamento viral foi executado utilizando duas linhagens celulares (Hep2 e NC1-292) em três diferentes metodologias (tubos estacionário, tubo *roller* e placas), tendo havido uma concordância de 95% entre elas. A utilização de duas passagens cegas, no décimo dia pós-inoculação, elevou o número de isolamentos positivos de 14/315 (4,4%) para 20/315 (6,3%) amostras processadas.

A análise filogenética da amostra de VSRH obtidas mostrou co-circulação dos grupos A e B nos anos de 2004 e 2005, e alternância dos genótipos predominantes nos dois anos sucessivos. Além disso, documentou-se a circulação de um novo genótipo do VSRH do grupo B, com uma inserção de 60 nucleotídeos, que foi recentemente descrito em outros países da América do Sul e nordeste da Ásia.

DESCRIPTORES: 1. VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO; 2. VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO/epidemiologia; 3. RECÉM-NASCIDO; 4.

CULTURA DE VÍRUS; 5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA
TRANSCRIPTASE REVERSA; 6. IMUNOFLUORESCÊNCIA; 7. GENÓTIPO

ABSTRACT

Reis, AD - Incidence of respiratory illness by human respiratory syncytial virus in a cohort of newborn in São Paulo city: comparison of techniques and genetic diversity.

In this study we analyzed a cohort of newborn children from 3 public hospitals from the city of São Paulo, aiming to evaluate the incidence and the genetic diversity of human respiratory syncytial virus. 270 healthy newborn children fulfilling inclusion criteria were enrolled from December 2002 to April 2005. Average follow up time was 113.5 month. 173 out of 270 newborns had at least one episode of respiratory illness; 92 presenting a single episode of disease and 81 presenting 2 or more episodes. 316 samples were obtained, and HRSV was detected in 36 samples (11.3%), with an incidence rate of 9.84/1000 children/month. Polymerase Chain Reaction (PCR) was the most sensitive technique, detecting 35 samples (11.1%), followed by immunofluorescence (25 samples, 7.9%) and viral isolation (20, 6.7%) ($p < 0.0001$). We were able to sequence 29 out of 35 samples amplified by PCR, and BLAST confirmed that all samples were from HRSV. Phylogenetic analyses revealed that 23 out of 29 sequences were not identical. However, we found 3 groups of identical sequences (4, 3 and 2 samples each), but none of these samples were manipulated at the same day. Therefore, although we cannot rule out PCR carry over within these identical samples, this hypothesis seems to be remote. Viral isolation was performed using Hep2 and NCI-292 cell lines according to 3 different methodologies, with 95% concordance between techniques. The use of 2 extra passages at day 10 after inoculation increased the positive results from 4.4% to 6.3%. Phylogenetic analyses also revealed HRSV clades A and B

cocirculating during 2004 and 2005, and a predominance of only one clade followed by a replacement by the other clade in the next years. Furthermore, we documented the appearance of an HRSV clade B genotype with a 60 bp insertion, which has been recently described in South America and Northeast Asia.

DESCRIPTORS: 1. RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS HUMAN; 2. RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS HUMAN/epidemiology; 3. INFANT NEWBORN; 4. VIRUS CULTIVATION; 5. REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION; 6. FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE 7. GENOTYPE

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - HISTÓRICO

O vírus sincicial respiratório humano (VSRH), foi isolado pela primeira vez por Morris *et al* (1956) de um chimpanzé de laboratório que apresentava sintomas de doença respiratória, durante uma epidemia. A epidemia ocorreu em 1955 no Walter Reed Army Institute of Research, *Washington*, D.C., numa colônia de 20 chimpanzés sadios. Os sintomas respiratórios da doença caracterizavam-se por tosses, espirros e secreção nasal purulenta.

Inicialmente este vírus foi chamado de *chimpanzee coryza agent* (CCA). No ano seguinte, um vírus semelhante foi isolado de duas crianças, uma com pneumonia e outra com laringotraqueobronquite, em Baltimore, e foi observada sua característica em produzir sincícios em cultura de células. Então o nome *chimpanzee coryza agent* foi substituído e deu-se ao vírus a presente designação por refletir sua origem humana, sua afinidade pelo trato respiratório e por sua habilidade em formar sincícios (Chanock *et al*, 1957 a; Chanock *et al* 1957b).

Estudos sorológicos realizados na época indicaram que a maioria das crianças em Baltimore já havia sido infectada com vírus sincicial respiratório humano (VSRH) antes dos quatro anos de idade. Outros estudos realizados em várias partes do mundo mostraram que o VSRH estava associado com doenças do trato respiratório inferior, como pneumonia e bronquiolite. Posteriormente foi evidenciado que VSRH era o principal patógeno de doenças do trato respiratório inferior durante a infância e também um importante agente viral de determinados grupos, como imunocomprometidos e idosos (Collins *et al.*, 2001; Falsey & Walsh, 2000).

No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez por Candeias em 1964 (Candeias, 1967). Foram estudadas 24 crianças hospitalizadas com quadro respiratório agudo. Desse total, foram isoladas quatro amostras de VSRH (uma criança com broncopneumonia e desnutrição, de três meses de idade; duas com broncopneumonia e bronquiolite, com três dias e três meses de idade, respectivamente; e uma com broncopneumonia, com 45 dias de idade). A confirmação do isolamento em cultura de células foi feita através da prova de neutralização utilizando o soro padrão.

1.2 - ASPECTOS VIROLÓGICOS

1.2.1 - Classificação

O vírus sincicial respiratório, com base em sua morfologia, está classificado como membro da Ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, sub-família *Pneumovirinae* e gênero *Pneumovirus* (Falsey & Walsh 2000; van Regenmortel *et al.*, 2000).

O VSRH constitui espécie tipo dentro do gênero *Pneumovirus*. Além do VSRH pertencem ao mesmo gênero o RSV bovino e o vírus da pneumonia do camundongo (MPV) (van Regenmortel *et al.*, 2000). Mais recentemente foi identificado o metapneumovírus humano (MPVh) (van den Hoogen *et al.*, 2001).

O VSRH é um vírus bastante lábil. É sensível a extremos de temperatura e pH, bem como a detergentes. A 55°C é rapidamente destruído e, a 37°C somente 10% de sua infectividade permanece após 24 horas. Após armazenamento a 4°C por uma semana, somente preserva 1% de sua infectividade (Tristram & Welliver, 1995).

1.2.2 - Estrutura

O vírus sincicial respiratório é pleomórfico, possui morfologia esférica. Seu virion é composto de um nucleocapsídeo envelopado de simetria helicoidal, com diâmetro variável entre 12 e 15nm. O seu envelope consiste de dupla camada lipídica que tem origem na membrana citoplasmática da célula hospedeira e possui espículas que são as glicoproteínas F e G de origem viral. A estrutura final envelopada apresenta entre 150 a 300nm (Collins *et al.*, 2001).

Cada partícula viral contém uma única cópia funcional do genoma. O genoma viral é composto de RNA de fita simples não segmentado de polaridade negativa (-ssRNA). Por não ser segmentado o vírus não tem a mesma capacidade de recombinação dos segmentos genômicos que o vírus da Influenza, no qual ocorrem os *shifts* antigênicos, responsáveis pelas pandemias. Contudo, como todos os vírus RNAs, o VSRH tem a capacidade de pequenas mutações genômicas, devido a dependência da RNA polimerase que perde a capacidade de correção e edição. O peso molecular do seu genoma aproximado é de 5×10^3 KD e contém 15.222 nucleotídeos (Collins *et al* 2001; Prober & Sullender, 1999; Welliver, 2003).

O genoma do VSRH possui cerca de 10 genes que codificam cerca de 11 proteínas. As proteínas não estruturais são atualmente designadas NS1 e NS2. Dentre as estruturais, três são proteínas de superfície de transmembrana (G, F e SH), duas estão presentes na matriz do vírus e são conhecidas por M e M₂₋₁, três estão associadas ao RNA genômico para formar o nucleocapsídeo viral (N, P, e L) e uma é regulatória (M₂₋₂) (Collins *et al*, 2001; Falsey & Walsh, 2000).

As proteínas F (proteína de fusão) e G (proteína de adsorção) glicosiladas, encontradas na superfície do envelope viral desempenham importante papel imungênico durante a infecção viral (Sullender *et al*, 1998; Tristam & Welliver, 1995).

As espículas da proteína F apresentam-se sob a forma homotetramérica, ou seja, cada espícula é formada por quatro unidades idênticas da proteína e induz a formação de anticorpos neutralizantes. (Sullender *et al*, 1998).

Já a proteína G, ao contrário da proteína F, não é conservada e pode ser homométrica ou homotetramérica (Collins *et al*, 2001). Em 1987, Levine *et al*, estabeleceram que a glicoproteína G tem a função de adsorção ao demonstrarem que anticorpos contra a proteína inibiam a ligação do vírus às células hospedeiras. Esta glicoproteína é análoga a hemaglutinina de outros vírus da família *Paramyxoviridae*, porém não possui ação hemaglutinante (Sullender *et al*, 1998; Wertz *et al.*, 1985; Tristam & Welliver, 1995).

A proteína SH (*small hydrophobic protein*) composta por 64 aminoácidos. Não se conhece a função exata da proteína SH, mas o fato de ser uma proteína transmembrana sugere que esteja envolvida com processos de adsorção, penetração ou desnudamento do vírus.

A proteína M, não glicosilada, é encontrada na matriz. Em geral, nos vírus RNA não segmentados e de polaridade negativa, a proteína M possui duas funções: tornar o nucleocapsídeo transcricionalmente inativo antes do seu empacotamento e mediar a associação do nucleocapsídeo com o envelope nascente. A proteína M dos *Pneumovirus* talvez possua as mesmas funções.

Assim como a proteína M, a M2-1 é interna e não glicosilada e atua na elongação durante a transcrição (Collins *et al*, 2001).

A proteína M2-2 também é interna e não glicosilada. Esta é uma proteína regulatória, envolvida na mudança da transcrição para a replicação do RNA viral durante o ciclo replicativo do vírus (Atreya *et al.*, 1998; Schmidt *et al*, 2001).

As proteínas N (*Nucleoprotein*), P (*Phosphoprotein*) e L (*Large protein*) estão presentes no nucleocapsídeo e junto ao RNA genômico, formam o complexo ribonucleoproteico.

A proteína L é a maior das proteínas. Acredita-se que seja a enzima RNA polimerase RNA dependente, com base em seu tamanho e localização no nucleocapsídeo. Contém seis segmentos que são altamente conservados e presumivelmente representam domínios funcionais.

A proteína P é altamente fosforilada e, provavelmente, como outros vírus RNAs não segmentados e de polaridade negativa, apresenta-se como um fator de transcrição e replicação.

A proteína N é a principal proteína não estrutural do nucleocapsídeo, estando estreitamente associada ao RNA genômico e relacionada com a regulação da transcrição e da replicação do ácido nucléico viral (Collins *et al*, 2001; Tristam & Welliver, 1995).

1.2.3 – Estrutura Genômica

O genoma viral do VSRH é composto por RNA de fita simples não segmentado de polaridade negativa, como já comentado anteriormente. O VSRH possui 10 RNAs mensageiros (mRNA) subgenômicos. Cada um possui uma ORF

(*Open reading frame*), exceto o M2, o qual possui duas ORFs, que codificam as proteínas M2-1 e M2-2 (Collins *et al*, 2001).

Figura 1 - Mapa Genético do VSRH (RNA) (www.ncbi.nlm.nih.gov)

A porção 3' do RNA genômico consiste de uma região extragênica de 44 nucleotídeos (região *leader*). Esta região é seguida por 10 genes na seguinte ordem: 3'NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 e L5'. O gene L é seguido de uma região extragênica de 155 nucleotídeos, que é mais tolerante à inserção ou a deleção de nucleotídeos.

Os primeiros nove genes são separados por regiões intergênicas que variam de 1 a 56 nucleotídeos de tamanho. Estas regiões intergênicas não parecem desempenhar um papel importante na expressão gênica, sendo pouco conservadas entre as amostras. Os dois últimos genes do VSRH (M2 e L) têm uma sobreposição de 68 nucleotídeos (*overlap*). Portanto, o gene L tem o início da sua transcrição dentro do gene M2 (Collins *et al*, 2001).

1.3 - CICLO REPLICATIVO DO VÍRUS

Ainda não foi identificada qual a macromolécula celular utilizada pelo vírus sincicial respiratório como receptor para a adsorção. Já as espículas da glicoproteína G exercem a função de anti-receptor viral. Para o gênero *Respirovirus* e *Rubulavirus* da subfamília *Paromyxovirinae*, o receptor celular é uma molécula que contém ácido siálico. Para o gênero *Morbillivirus*, que

diferentemente dos outros gêneros não possui atividade de neuraminidase, foi descoberto que o receptor celular é o CD46. Para os *Pneumovirus* especula-se a possibilidade de que o receptor também não seja uma molécula contendo ácido siálico, uma vez que nesse gênero, assim como nos *Morbilivirus*, não existe a presença de uma neuraminidase (Collins *et al*, 2001; Kingsbury, 2001).

Após a adsorção do virion à célula hospedeira há liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. Esse evento é mediado por uma proteína de superfície, a glicoproteína F, que é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana celular, promovendo a liberação do nucleocapsídeo diretamente no citoplasma da célula hospedeira (Kingsbury, 2001). Todas as etapas do ciclo replicativo do VSRH ocorrem no citoplasma sem envolvimento do núcleo celular.

Com o nucleocapsídeo liberado no citoplasma tem início o processo de transcrição do genoma viral. Os genes são transcritos na direção 3'→ 5' a partir de um único 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, inicia-se a transcrição por um mecanismo sequencial de início-fim, guiada pelos sinais de início (*start-gene*) e fim (*end-gene*). O resultado é a síntese de uma série de mRNAs subgenômicos. Os mRNAs parecem ser cópias exatas dos genes, não havendo evidências de modificações como um *splicing*, por exemplo. Os mRNAs transcritos recebem um *cap* na ponta 5' e são poliadenilados na ponta 3' (Collins *et al*, 2001).

A maturação do vírus ocorre com a montagem do nucleocapsídeo pela combinação da proteína N com o RNA genômico seguida da adição das proteínas

P e L. A montagem do envelope se dá com as glicoproteínas virais, modificadas por glicosilação durante seu transporte através do retículo endoplasmático e do Complexo de Golgi, ocupando o lugar das proteínas celulares na membrana plasmática. Em seguida, as proteínas da matriz se agregam na porção interna do envelope nascente. Por último, o nucleocapsídeo alcança a superfície e ocorre o brotamento do mesmo, levando consigo uma porção da membrana plasmática (Kingsbury, 2001).

1.4 - CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E MOLECULAR

Coates & Chanock (1963) foram os primeiros a observar as diferenças antigênicas entre duas amostras (A1 e Long) do VSRH. Em um estudo seguinte, Coates *et al* (1966) observaram diferenças antigênicas entre outras amostras virais, Long e CH18537. A cepa Long foi isolada em 1956 de uma criança com pneumonia, enquanto a cepa CH-18537 foi isolada em 1962 de uma criança com doença do trato respiratório superior. Ambos os estudos utilizaram a reação de neutralização com soro de animal hiper-imune (coelhos ou cobaias). Nestes estudos demonstrou-se que amostra A1 não era neutralizada pelo soro preparado com a amostra Long ou CH18537, sugerindo, assim, que diferentes variantes poderiam estar circulando simultaneamente na mesma população. Outros estudos confirmaram as observações anteriores (Coates *et al*, 1966; Wulff *et al*, 1964).

Com o surgimento dos anticorpos monoclonais (MAbs) essas diferenças antigênicas mostraram-se mais definidas (Gimenez *et al*, 1984; Anderson *et al*, 1985). Esta variabilidade antigênica pode ser visualizada pelas diferenças de títulos de anticorpos neutralizantes. O título de anticorpos neutralizantes pode ser até quatro vezes maiores quando testado com amostras do mesmo grupo. Foram

testados MAb's para as proteínas P e N e as glicoproteínas F e G. Foram os trabalhos de Anderson *et al* (1985) e Mufson *et al* (1985) entretanto, que estabeleceram a divisão do VSRH em grupos antigênicos (A e B) com base na reatividade com um painel de MAb's.

Estudos posteriores demonstraram que os dois grupos, A e B, têm aproximadamente 25% de homologia no geral. Alguns trabalhos mostraram que o dimorfismo antigênico entre os grupos A e B é maior na glicoproteína G, com uma correlação antigênica de 1% a 7%, conferindo vantagem para o vírus em termos da evasão de uma resposta imune preexistente. Crianças de tenra idade parecem não montar uma resposta imunológica vigorosa contra a glicoproteína G, enquanto que a proteína F apresenta uma correlação de 50% entre os dois grupos (Hendry *et al* 1988; Johnson *et al* 1987; Mufson *et al* 1985; Queiroz *et al.*, 2002).

Posteriormente, outros estudos demonstraram haver diferenças antigênicas dentro de cada um dos grupos, possibilitando a divisão em subgrupos. A princípio, foram identificados sete subgrupos do tipo A (A1 a A7) e 3 do tipo B (B1 a B3) (Anderson *et al*, 1991; Hall *et al.*, 1990). Hall *et al* (1990) descreveram mais um subgrupo dentro do grupo B (B4).

Os estudos de variabilidade antigênica foram complementados por estudos de variabilidade genética, que corroboraram a ocorrência dos dois grupos e abriram novos horizontes no sentido de proporcionar um melhor entendimento com relação à circulação e evolução do VSRH (Cane *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 1987; Sullender *et al*, 1991; Sullender, *et al.*, 1993; Sullender *et al.*, 1998). Novas metodologias foram aplicadas para o melhor esclarecimento da variabilidade genética, dentre as quais, a hibridação de ácidos nucleicos, a reação em cadeia

por polimerase (PCR), análise da seqüência de nucleotídeos e outros. Todos os estudos de variabilidade genética do VSRH usaram as amostras virais Long e A2 identificadas pelos MAbs como grupo A e a amostra CH-18537 identificada como grupo B. De acordo com os trabalhos citados acima, os grupos A e B apresentam, entre si, 33% de divergência na seqüência de nucleotídeos da proteína G e 47% dos aminoácidos.

Atualmente, há descrição na literatura de mais um genótipo (SAV1) do grupo A, totalizando oito subgrupos e mais três genótipos (SAB1, SAB2 e SAB3) do grupo B, totalizando sete subgrupos (*GeneBank*). Recentemente há mais um genótipo (BA) do grupo B do VSRH descrito na literatura, circulando na América do Sul e nordeste da Ásia (Nagai *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004; Trento *et al.*, 2003; Venter *et al.*, 2001).

Desde a confirmação da existência dos dois grupos antigênicos do VSRH, grandes investigações têm sido realizadas no intuito de demonstrar variantes antigênicas dentro de cada grupo e sua relação com a gravidade da doença pelo VSRH e também a alta incidência das reinfecções causada por este vírus (Anderson *et al.*, 1991; Sullender *et al.*, 1998; Valdivia *et al.*, 1999). Estudos relataram que a divergência entre os aminoácidos da proteína G dentro de um mesmo grupo pode ser de até 20% (Cane *et al.*, 1991; Sullender *et al.*, 1998).

Foram realizados, também, estudos comparando as seqüências dos genes NS1, SH e N, porém a variação é bem menor. A similaridade de nucleotídeos e aminoácidos encontrados foi: 72% e 76% para o gene SH, 83% e 87% para o gene NS1 e 86% e 96% para o gene N (Johnson *et al.*, 1987).

Na Gâmbia, a análise da sequência da proteína G do VSRH mostrou que os subgrupos circulantes em quatro anos consecutivos são os mesmos identificados em outras partes do mundo. Entretanto, muitas das variantes isoladas no ano de 1993 e 1994 não foram encontradas circulando na Europa e em outros países desenvolvidos no mesmo período (Webber *et al.*, 1998).

Vários estudos baseados apenas nas propriedades antigênicas foram realizados no sentido de elucidar o padrão de circulação do VSRH, o que possibilitou algumas conclusões: a co-circulação dos grupos durante os surtos e a variação do padrão de circulação de subgrupos em diferentes comunidades durante o mesmo ano, não sendo encontrado um subgrupo que causa epidemias de caráter nacional ou mundial (Anderson *et al.*, 1991; Hendry *et al.*, 1986). O conhecimento da variação antigênica e suas implicações são fundamentais para o desenvolvimento da vacina para VSRH.

1.5 - ASPECTOS CLÍNICOS

O VSRH replica-se nas células do trato respiratório, causando um processo inflamatório que inclui destruição do epitélio, edema e aumento de produção de muco. Após um período de incubação de 3 a 5 dias, ocorrem as primeiras manifestações clínicas, típicas de um resfriado comum, com secreção nasal clara, tosse moderada, febre baixa e, algumas vezes sibilância, evoluindo geralmente, para a recuperação no período de uma a três semanas. A tosse é um dos sintomas mais comuns e afeta cerca de 90 a 97% dos pacientes. A febre é observada em aproximadamente 50% das pessoas com doença respiratória pelo VSRH, contra 75% das infecções pelo vírus Influenza e das infecções bacterianas. Embora as temperaturas ocasionalmente alcancem 39 a 40° C são, via de regra,

mais baixas do que as observadas nas infecções pelo vírus da Influenza (Falsey & Walsh, 2000; Polak, 2004).

Nas infecções pelo VSRH, também podem aparecer sintomas como diminuição do apetite, além da ocorrência de complicações como otite média e sinusite (Hall *et al*, 1978; Pitkaranta *et al*, 1998; Winther *et al*, 2002).

As infecções respiratórias agudas (IRAs) têm sido as causas principais de morbidade e mortalidade em crianças de até 5 anos de idade em todo o mundo, sendo consideravelmente maior nos países em desenvolvimento (Law *et al.*, 2002). Dentre os causadores destas infecções, o vírus respiratório sincicial tem sido apontado como o responsável pela maioria dos casos de IRAs em crianças menores de um ano de idade (Miyao *et al.*, 1999). O VSRH é o agente viral mais freqüente do trato respiratório inferior em lactentes e crianças de idade reduzida (Saijo *et al.*, 1994). O VSRH anualmente contribui, direta ou indiretamente, com 600.000 a 1.000.000 de mortes em crianças com idade inferior a 5 anos (Polak, 2004).

Entretanto pacientes prematuros (Atkin *et al.*, 2000; Carbonell-Estrany *et al.*, 2002; Queiroz *et al.*, 2002), idosos (Falsey & Walsh, 2000), pacientes com cardiopatias congênitas (McDonald *et al*, 1982), portadores de leucemia (Whimhey *et al.*, 1995; Whimhey *et al* , 1996), imunocomprometidos (Englund *et al.*, 1998), tais como receptores de transplante (Machado *et al.*, 2003; McCarthy *et al.*, 1999) e pacientes portadores de HIV (Falsey & Walsh, 2000), podem evoluir para um quadro clínico mais grave, com acometimento importante do trato respiratório inferior, acarretando quadros de taquipnéia, pneumonia, bronquiolite e bronquite, e que, muitas vezes, levam à hospitalização, necessitando de intubação e

ventilação mecânica. As manifestações clínicas dependem muito da magnitude da imunodepressão.

A migração do vírus do trato respiratório superior ao trato respiratório inferior provavelmente envolve a aspiração de secreções ou migração via epitélio respiratório. A bronquiolite resulta da destruição do epitélio bronquiolar, inflamação peribronquiolar, edema dos tecidos das vias aéreas e produção de muco. A obstrução das vias aéreas pode resultar também em enfisema e colapso da porção distal do pulmão (Polak, 2004). Miyao *et al.* (1999) constataram uma significativa presença do VSRH na maior parte dos casos de crianças internadas com patologia aguda do trato respiratório inferior. Este vírus estava associado a 84% dos casos de bronquiolite e à metade dos casos de pneumonias (46,4%). Durante uma epidemia de VSRH em Rochester nos EUA, o VSRH foi responsável por 87% dos casos de crianças hospitalizadas por pneumonia e bronquiolite. Entre as crianças com pneumonia, 96% tinham menos do que 6 meses de idade (Hall *et al.*, 1975).

O acometimento bronquial difuso e/ou a condensação alveolar focal, foram os padrões clínicos mais freqüentemente associados aos casos de infecção pelo Vírus Respiratório Sincicial em crianças hospitalizadas no município de São Paulo (Vieira *et al.*, 2001). Um estudo com crianças de 2 meses a 16 anos de idade atendidas no serviço de pronto atendimento de hospital geral observou uma alta prevalência dos vírus respiratórios em crianças com chiado. Em crianças até 24 meses de idade o VSRH apresentou uma prevalência de 68% , enquanto que em crianças mais velhas 71% dos casos foram associados ao rinovírus (Rakes *et al.*, 1999). Há evidências de que aproximadamente 2 em cada 3 episódios agudo

de chiado foram desencadeados por infecções virais nos primeiros anos de vida, que tendem a desaparecer durante os primeiros anos de escola (Silvestri *et al.*, 2004).

Além de induzir episódios agudos de chiado, particularmente bronquiolite nos dois primeiros anos de vida, as infecções por VSRH têm sido entendidas como fatores de risco importantes para o desenvolvimento subsequente de asma e sensibilização a alérgenos inalantes, particularmente em indivíduos com predisposição genética para atopia e asma (Camara *et al.*, 2004; Ogra, 2004; Sigurs *et al.*, 1995; Silvestri *et al.*, 2004; Welliver, 2003).

Não existem estimativas exatas sobre as taxas de letalidade, mas estudos indicam que em torno de 0,5% a 1,0% dos casos de infecção por VSRH resultam em morte em crianças hospitalizadas em países desenvolvidos (Holberg *et al.*, 1991; Nyati, *et al.*, 2002; Ogra, 2004). Alguns estudos demonstram que a letalidade por VSRH é maior em crianças que apresentam alguns antecedentes que predispõem à doença mais grave. Um estudo realizado em crianças com doenças cardíacas congênitas, que eram admitidas ao hospital com infecção pelo VSRH ou que o adquiriram durante a hospitalização, mostrou que estas crianças apresentaram um risco maior de desenvolver uma doença grave ou fatal (MacDonald *et al.*, 1982). A taxa de letalidade dentre lactentes com doenças cardíacas congênitas e infecção por VSRH foi de 37% em comparação aos 6,5% de mortes dentre as crianças sem cardiopatias. Crianças com doenças pulmonares e prematuros também são grupos que apresentam alto risco de doença grave ou fatal (Groothuis *et al.*, 1988; Shay *et al.*, 2001). Um estudo retrospectivo multicêntrico observou que a infecção pelo VSRH em pacientes com

VSRH com doença cardíaca congênita ou com doença pulmonar crônica tinham índices maiores de mortalidade (3,4% e 3,5%, respectivamente) quando comparada à observada em pacientes saudáveis (1%). Além disso, os grupos com doença cardíaca congênita ou com doença pulmonar crônica apresentam duração maior da terapêutica de oxigenação suplementar (Holberg *et al*, 1991; Nyati *et al.*, 2002).

O VSRH tem sido cada vez mais reconhecido como um importante patógeno dentro a população idosa, principalmente aquela parcela da população que vive em asilos e casas de repouso. Os sintomas da infecção pelo VSRH são mais variáveis nesta população, estendendo-se de um leve resfriado a um grave problema respiratório (Falsey, 1998 ; Falsey & Walsh, 2000 ; Han *et al*, 1999) .

Nos adultos imunocomprometidos, a infecção por VSRH está associada à morbidade e letalidade significantes, apesar da gravidade das manifestações clínicas depender da magnitude da imunodepressão. No geral, a progressão clínica da infecção por VSRH nos adultos imunocomprometidos parece seguir um padrão semelhante ao dos dos hospedeiros imunocompetentes, com infecção inicial no trato respiratório superior progredindo para doença no trato respiratório inferior (Falsey, 2000). Em imunocomprometidos portadores de leucemia com pneumonia pelo VSRH podem ser observadas taxas de letalidade em torno de 20% (van Elden *et al.*, 2002). Outra associação com alta letalidade é observada em receptores de órgãos, principalmente nos primeiros 20 dias pós-transplante (Pohl *et al.*, 1992). Em pacientes que se submeteram a transplante de medula óssea, a taxa de letalidade é de 45% a 80% dentre os que se infectam com o VSRH (Bowden 1997 ; Harrington *et al*, 1992; Ogra,2004 ; Whimbley *et al* , 1996).

1.6 - EPIDEMIOLOGIA

O vírus respiratório sincicial humano possui distribuição mundial, podendo acometer todas as faixas etárias. A transmissão pode ocorrer por contato com secreções, via aerossol, e mais freqüentemente por fômites, sendo um importante agente de infecção nosocomial (Hall *et al*, 1975). O VSRH pode sobreviver por mais de 6 horas em várias superfícies, sendo muito infeccioso quando aplicado diretamente na mucosa ocular ou nasal por mãos ou objetos contaminados (Falsey & Walsh, 2000; Tristram & Welliver, 1995).

Cerca de 95% das crianças têm a primeira infecção pelo VSRH durante primeiros dois anos de vida, estando o pico da incidência entre dois e sete meses de vida (Anderson *et al.*, 1990), podendo causar bronquiolite e pneumonia. Apesar das reinfecções serem comuns durante toda vida, os sintomas em crianças mais velhas e adultos são mais brandos e ficam, geralmente, limitadas ao trato respiratório superior (Hall *et al.*, 1991). Por outro lado vários fatores podem influenciar a gravidade da doença, como fatores ambientais, exposição passiva ao tabaco, dentre outros (Holberg *et al*, 1991 ; Nyati & Sreekumar, *et al.*, 2002 ; Queiroz *et al.*, 2002).

Epidemias pelo VSRH são facilmente identificadas na comunidade, pois há um aumento do número de casos de bronquiolites e pneumonias e subseqüentemente um aumento no número de admissões hospitalares em crianças com problemas no trato respiratório baixo. Alguns estudos realizados em crianças no primeiro ano de vida demonstram que um terço das que apresentaram infecção pelo VSRH desenvolveram doença do trato respiratório inferior. Dados do CDC mostram que nos EUA, o VSRH é responsável por 120.000 admissões

hospitalares anuais em bebês e crianças pequenas. (Holberg *et al.*, 1991; Parrot *et al.*, 1973; Shay *et al.*, 1999). Em países em desenvolvimento, como Moçambique, Indonésia e África do Sul a incidência do VSRH foi de 5, 10 e 9 em 1000 crianças com infecção no TRI, respectivamente (Robertson *et al.*, 2004).

O VSRH também foi o mais incidente em crianças menores de 3 meses de idade submetidas à ventilação mecânica com infecções nosocomiais do trato respiratório inferior (Diniz *et al.*, 1999).

O conhecimento dessa virose é menor nos países em desenvolvimento. No Brasil, um estudo realizado por Vieira *et al.* (2001), na cidade de São Paulo, mostrou que todas as crianças acometidas por este vírus tinham idade inferior a 3 anos e, em sua maioria menos de 1 ano. Esse estudo envolveu, contudo, somente crianças hospitalizadas com doença do trato respiratório inferior. Na cidade do Rio de Janeiro foi realizado um estudo transversal em 1997 e 1998, onde o VSRH foi o principal causador de infecções do TRI em lactentes que necessitaram de hospitalização (D'Elia *et al.*, 2005).

Nas regiões de clima temperado e sub-tropical a infecção pelo VSRH apresenta uma sazonalidade bem definida, ocorrendo anualmente no período de outono tardio, inverno e início da primavera. Cada epidemia dura cerca de cinco meses, com 40% dos casos ocorrendo durante os meses de pico, geralmente no meio do surto (Collins *et al.*, 2001). Em países de clima temperado, como Estados Unidos, Japão e França, geralmente os surtos ocorrem de novembro a abril, com picos nos meses de dezembro e janeiro (inverno) (Brouard *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1990; Hendry *et al.*, 1986; Hendry *et al.*, 1989; Karron *et al.*, 1999; Mufson *et al.*, 1991; Tsutsumi *et al.*, 1988).

Diferentemente do que se observa nas regiões de clima temperado ou subtropical, em localidades com clima sub-equatorial, diversos estudos relatam o isolamento do VSRH o ano inteiro. Em Papua Nova Guiné, o VSRH é isolado durante todo o ano, com picos nos meses mais chuvosos (março e abril). No Havaí, os picos de ocorrência também estão relacionados ao período mais chuvoso (outubro a abril), sendo o VSRH isolado todo o ano. Em Melbourne, Sydney e Newcastle (Austrália), a epidemia se estende de abril a setembro, com pico em julho (Hierholzer *et al.*, 1994 ; Reese & Marchette 1991).

Segundo Vieira *et al* (2001), no município de São Paulo, a sazonalidade apresentada pelo VSRH é bastante marcante, estendendo-se, predominantemente, pelo outono-inverno com pico em maio e junho. No Rio de Janeiro um estudo longitudinal sobre doença respiratória realizado entre 1982 - 1985 mostrou alta incidência do VSRH nos casos mais graves de infecção respiratória aguda. As amostras positivas para VSRH apareceram principalmente durante o outono, nos 4 anos consecutivos do estudo, indicando uma ocorrência sazonal. Os serviços de pronto atendimento, de acordo com este trabalho, são as melhores fontes de dados para a vigilância do VSRH, onde, um aumento de casos positivos corresponde a um aumento no número total de casos de infecção respiratória aguda (Nascimento *et al*, 1991). Embora as infecções respiratórias agudas sejam importante causa de morbidade e letalidade no sul do Brasil, poucas e esparsas informações são disponíveis sobre a sazonalidade e a etiologia viral do VSRH. Em trabalho realizado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, o VSRH foi mais freqüente em menores de 1 ano, nos três níveis de atenção à saúde, sendo mais prevalente em menores de 6 meses. O VSRH juntamente com adenovírus foram

responsáveis por 91,4% dos diagnósticos virológicos positivos com picos de incidência ocorrendo regularmente entre os meses de julho e agosto (Straliotto *et al.*, 2002).

Um estudo realizado em neonatos com pneumonia intersticial por VSRH mostrou que 51,4% dos episódios ocorreram no outono e 48,6% no inverno, confirmando a sazonalidade (Diniz *et al.*, 1999).

Na população de receptores de medula óssea no município de São Paulo a infecção pelo VSRH mostrou predomínio entre o outono e inverno, de maneira semelhante aos achados nos EUA (Machado *et al.*, 2003).

Independentemente da sazonalidade, a gravidade da doença do trato respiratório pode variar a cada surto. Flutuações no grupo e cepas circulantes pode contribuir para a variação da gravidade anual de cada surto (Hall *et al.*, 1990).

O padrão de circulação dos tipos A e B aparece com grande variação de local para local e de ano para ano. Vários estudos demonstram que os dois tipos têm circulado comcomitantemente em muitas epidemias em diversas regiões do mundo, com predominância de um deles. Segundo Anderson *et al* (1990) e Hendry *et al* (1989), não há ligação epidemiológica entre as comunidades, ocorrendo como um fenômeno local ou regional e não nacional. Ocorre de forma distinta à observada com o vírus Influenza, onde as epidemias apresentam caráter nacional e até mesmo internacional em relação à cepa circulante.

Um estudo de três anos realizado na região do Delta dos rios Yukon e Kuskokwin no Alaska, observou a circulação somente do tipo A nos dois primeiros anos do estudo e de ambos os tipos no terceiro ano (Karron *et al* ,1999). Outros

dados da literatura confirmam que os dois tipos têm circulado conjuntamente em muitas epidemias em várias regiões do mundo. Estudos realizados em Boston (Henry *et al.*, 1989) e Huntington (Akerlind & Norrby, *et al.*, 1988) nos EUA, San Salvador em El Salvador (Zelaya *et al.*, 1994) e Santa Fé na Argentina (Imaz *et al.*, 2000) revelaram a presença de ambos os tipos durante os surtos, com predominância do tipo A.

Algumas localidades como Rochester nos EUA (Hall *et al.*, 1990), Sapporo no Japão (Tsutsumi *et al.*, 1988) e Caen na França (Brouard *et al.*, 1993), apresentam grandes variações na prevalência de um ou outro grupo. Em alguns anos observam-se a prevalência do grupo A, em outros do grupo B e ainda observa-se anos em que há um equilíbrio de ambos os grupos. Já em Turku na Finlândia e Copenhagem na Dinamarca, observou-se a alternância na prevalência do grupo nos surtos (Hornsleth *et al.*, 1998 ; Waris *et al.*, 1991).

Há também variantes dos grupos A e B do VSRH circulando concomitantemente. Stensballe *et al.*, (2003) em um trabalho de revisão observaram que há vários subgrupos circulantes ao mesmo tempo em uma comunidade, porém eles geralmente não circulam simultaneamente em duas ou mais comunidades. Alguns trabalhos mostram que vários genótipos (subgrupos) estão presentes em uma epidemia (Cane & Pringle, 1995 ; Valdivia *et al.*, 1999). O grupo A do VSRH apresenta uma maior variação antigênica que a do grupo B. Tal fato pode explicar a predominância do grupo A em relação ao grupo B (Coggins *et al.*, 1998).

No Brasil, Siqueira *et al* (1991) classificaram 87 isolados de VSRH na cidade do Rio de Janeiro no período de 1982 a 1988. Ambos os grupos A e B

foram identificados em cada epidemia, embora sempre houvesse predomínio de um dos grupos. Dentre as variantes antigênicas foram identificadas quatro do grupo A e três do grupo B, assim também como o estudo realizado por Cintra *et al* (2001) no município de Ribeirão Preto, São Paulo. Botosso (2002) realizou um estudo em crianças hospitalizadas em um hospital universitário no município de São Paulo, encontrou também uma co-circulação de ambos os grupos em 3 anos de estudo.

As diferenças de patogenicidade entre os grupos A e B ainda não estão definidas. Após a descoberta de que o VSRH apresentava dois grupos antigênicos, passou-se a especular se haveria influência dos tipos de vírus na gravidade da doença. Alguns estudos concluíram que as infecções pelo tipo A resultam em doenças mais graves (Falsey & Walsh 1997; Hall *et al*, 1990; Imaz *et al.*, 2000 ; Hall, Walsh, *et al.*, 1990). Por outro lado, Zelaya *et al.* (1994) e Hornsleth *et al.* (1998) constataram maior gravidade em crianças infectadas pelo grupo B, embora os primeiros tenham analisado poucas amostras. Há ainda autores que não observaram em seus estudos diferenças significativas de patogenicidade entre os tipos (Brouard *et al.*, 1993; Cintra *et al.*, 2001; McIntosh *et al.*, 1993; Russi *et al.*, 1989; Straliotho *et al.*, 1994; Struck *et al.*, 2004). Buckingham *et al* (2000) e Vieira *et al* (2001) não relacionaram maior ou menor gravidade da doença com o tipo do vírus, mas com a quantidade de vírus presente na secreção.

Os dados disponíveis na literatura são por vezes conflitantes, não ficando clara a existência ou não de diferenças de patogenicidade entre os tipos. Com o trabalho realizado por Peret *et al.* (1998), no qual se identificam genótipos de VSRH, passou-se a especular se haveria influência, não apenas do grupo, mas do

genótipo sobre a gravidade da doença. Ou, ainda, se a maior ou menor gravidade poderiam estar relacionadas à presença ou não de anticorpos herdados da mãe, específicos para o genótipo de vírus com o qual a criança se infectou. Martinello *et al.* (2002) observaram em seu estudo que o genótipo GA3 pode estar associado com a gravidade da doença. Já um estudo de coorte e multicêntrico demonstrou não haver uma associação entre a gravidade e o genótipo do VSRH (Struck *et al.*, 2004).

Cintra *et al.* (2001) mostraram uma co-circulação dos dois grupos, A e B, em um estudo retrospectivo realizado na emergência do hospital da Universidade de São Paulo, situado na cidade de Ribeirão Preto. Contudo, não houve uma associação do grupo com a gravidade da doença, mas uma tendência maior na gravidade dos casos em crianças infectadas pelo VSRH do grupo B. Além disso, há uma variedade de fatores que podem também determinar a gravidade da doença pelo VSRH, como interação entre a patogenecidade intrínseca do vírus, fatores hospitalares e condição sócio-econômica da família (Silvestri *et al.*, 2004; Ogra *et al.*, 2004).

A alta incidência de reinfecções durante os primeiros anos de vida e até mesmo depois de adulto pode estar relacionada à variação antigênica. Contudo, as observações de que várias das reinfecções envolvem um vírus do mesmo grupo, sugerem que as variações antigênicas intra-grupos podem ser importantes epidemiologicamente (Hierholzer *et al.*, 1994; Norrby *et al.* 1987; Sullender, 1998). Estudos de epidemiologia molecular mostram a existência de várias cepas circulando concomitantemente em um mesmo surto, que tendem a diminuir nos surtos subseqüentes até o desaparecimento, mostrando a ocorrência de *shifts*

antigênicos a cada epidemia. Portanto, é de extrema relevância identificar o padrão epidemiológico do vírus em epidemias de diferentes comunidades para um melhor entendimento da imunidade após uma infecção natural e posterior desenvolvimento de uma vacina (Botosso, 2000; Choi & Lee., 2000; Coggins *et al.*, 1998; Peret *et al.*, 1998).

1.7 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Para otimização do diagnóstico das infecções respiratórias virais agudas, várias técnicas virológicas necessitam serem empregadas.

Um dos métodos diagnósticos mais utilizados para detecção do VSRH é o isolamento viral em culturas celulares. Esta técnica permite a “amplificação” de pequena quantidade de vírus que está presente na amostra (Halstead *et al.*, 1990). A presença do vírus é observada pelo aparecimento de efeito citopático visível ao microscópio óptico.

O isolamento do vírus em cultura celular é considerado o padrão ouro para o diagnóstico do Vírus Sincicial Respiratório. O VSRH cresce em uma variedade de linhagens celulares, porém é melhor cultivado em células epiteliais humanas, tais como Hep2 (carcinoma epitelial de laringe humano) e HeLa (carcinoma epitelial de cervix humano). Outras linhagens como Vero (rim de macaco) e fibroblastos humanos também são úteis para o isolamento do VSRH, mas não são tão sensíveis quanto às linhagens epiteliais humanas (Falsey, 2000; Tristram & Welliver, 1995). A linhagem celular considerada mais eficiente para o isolamento e a propagação do VSRH é a Hep2. Hierholzer *et al.* (1993) demonstraram que a linhagem NCI-H292, originalmente derivada de um carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano, também é bastante sensível e pode ser usada

satisfatoriamente para o isolamento do VSRH. Um estudo realizado com diferentes linhagens celulares mostrou que uma combinação delas linhagens para o isolamento do VSRH é mais eficiente do que a utilização de somente um tipo. Com a utilização de três linhagens celulares chega 95% de sensibilidade e de duas linhagens 90%. Entretanto estes números só foram obtidos quando há presença das células Hep-2 entre as linhagens para o isolamento do VSRH (Arens *et al.*, 1986).

O aparecimento do efeito citopático, ou seja, a formação de células gigantes e sincícios resultante da fusão de células, ocorre em geral de 3 a 7 dias ou mais da inoculação do vírus (van Elden *et al.*, 2002). Embora o vírus cresça em uma variedade de linhagens celulares, o efeito citopático e o título viral dependem da cepa viral e das condições das células. Título maior que 10^7 PFU/ml é difícil de ser obtido, principalmente em amostras isoladas de adultos, já que a excreção nesse grupo é baixa (até 10^3 PFU/ml) e de curta duração (de 3 a 4 dias). Por isso, a sensibilidade do isolamento viral nessa população é baixa. Já em crianças, a excreção do vírus é alta (em torno de 10^6 PFU/ml) e com uma duração de 21 dias em crianças hospitalizadas com comprometimento do trato respiratório inferior. Hall *et al.* (1975 e 1976), obtiveram títulos de replicação do VSRH de 10^6 PFU/ml de secreção nasal na primeira infância.

De acordo com uma revisão realizada por Hughes em 1993, a utilização do *roller* no isolamento viral otimizaria o aparecimento do efeito citopático para o VSRH. A centrifugação da placa de cultura após inoculação do material clínico também poderia aumentar a eficiência do isolamento, por facilitar a adsorção do vírus na linhagem celular (Hughes, 1993).

Vários outros fatores poderiam interferir, entretanto, na eficácia do isolamento, destacando-se, por exemplo, as condições de coleta e o manuseio das amostras. O VSRH é um vírus termolábil, necessitando de condições adequadas para o transporte, tais com rapidez (entre 1 a 2 horas após a coleta) e refrigeração (4°C), pois a titulação do vírus na amostra clínica pode cair rapidamente à temperatura ambiente (Englund *et al.*, 1996; Falsey & Walsh, 2000). Alguns trabalhos sugerem que as amostras virais devem permanecer a 4°C de 3 a 5 horas e depois devem ser estocadas a -70 °C, podendo, desta forma, as amostras podem permanecer viáveis (Hall *et al.*, 1975; Kellogg, 1991).

Um outro fator que pode interferir no isolamento viral do VSRH é a presença de bactérias ou até mesmo de enterovírus, diminuindo ou até mesmo anulando o efeito citopático produzido pelo VSRH (Bromberg *et al.*, 1987; Kellogs, 1991). A visualização do efeito citopático em culturas celulares pode ser dificultada, também, pelo fato das células mais eficientes para o isolamento do VSRH, como a Hep2, crescerem formando mais de uma camada celular (Bromberg *et al.*, 1991). Atualmente a cultura viral que apresenta efeito citopático característico para o VSRH é confirmada por imunofluorescência, geralmente com anticorpos monoclonais comerciais (van Elden *et al.*, 2002).

O *shell-vial* (SV) é bastante usado para reduzir o tempo da cultura viral. Este teste mostrou uma boa correlação com cultura viral tradicional na detecção dos vírus respiratórios nas patologias agudas. O SV detectou 94,1% dos isolados em 48 horas contra 98,2% da cultura viral em aproximadamente 6 dias, sendo que dos 160 isolados, 128 eram VSRH (Navarro-Marí *et al.*, 1999).

Atualmente, técnicas rápidas estão disponíveis para boa parte dos vírus

respiratórios, incluindo o vírus sincicial respiratório. Estudos recentes enfatizam a importância das técnicas rápidas no diagnóstico destes vírus e na evolução clínica dos pacientes, em comparação com as técnicas convencionais (Barenfanger *et al.*, 2000; Hall, 2001). Em pacientes imunocomprometidos, o diagnóstico rápido é um critério importante para a terapêutica precoce, principalmente em transplantados de medula óssea e prematuros que necessitam de intervenções rápidas (Englund *et al.*, 1996). Com um diagnóstico rápido também se podem evitar as infecções nosocomiais, isolando o paciente diagnosticado com infecção pelo VSRH (Hall *et al.*, 1978).

A técnica de imunofluorescência (IF) é largamente utilizada para detectar o VSRH em células epiteliais de nasofaringe ou para a confirmação do isolamento viral em cultura celular. Este teste é um método rápido e de fácil execução quando comparado ao isolamento, o que resulta em menor tempo de trabalho. A exemplo do que se obtém no isolamento viral, o emprego do lavado nasal permite um aumento significativo na detecção dos vírus respiratórios quando comparado com os *swabs* de nasofaringe e de garganta, para qualquer técnica. Além de oferecer uma vantagem adicional que é a estabilidade das amostras fixadas em lâminas (Kellogg 1991; Welliver, 1988).

Uma desvantagem da imunofluorescência é a necessidade de pessoal bem treinado para a leitura, já que se pode ter inespecificidade devido à presença de muco na amostra. Entretanto o muco pode ser retirado com o uso de agentes mucolíticos como a N-acetil-cisteína. Os padrões de fluorescência observados dependem dos monoclonais utilizados: monoclonais contra as glicoproteínas de superfície (F e G) apresentam um padrão de fluorescência de membrana,

enquanto que monoclonais contra proteínas do nucleocapsídeo (N e P) apresentam padrão citoplasmático de fluorescência. Outra desvantagem é a qualidade da amostra, que deve conter um bom número de células, por isso a coleta deve ser realizada somente por pessoal treinado, além de transporte e processamento adequado para que as células não sejam destruídas. (Fulton & Middleton, 1974; Tristram & Welliver, 1995).

Outro teste que pode ser utilizado para a detecção rápida do VSRH é o imunoenzimático. Os ensaios imunoenzimáticos possuem algumas vantagens quando comparados à fluorescência, já que não necessitam de células intactas do trato respiratório, e pelo seu potencial de automação que permitiria o processamento de um número grande de amostras simultaneamente. Além disso, o método é mais objetivo na interpretação dos resultados do que a fluorescência (Kellogg 1991). A desvantagem da técnica imunoenzimática é que esta parece não ser tão sensível quanto a imunofluorescência, além de poder apresentar resultados falso-positivos (Abels *et al.*, 2001; Falsey *et al.*, 2002; Kellogg 1991).

Um estudo realizado por Hughes *et al* em 1988 compara o diagnóstico do VSRH em amostras clínicas pelo isolamento em cultura celular, teste imunoenzimático e imunofluorescência (IF). Foi observado que ambos os testes de imunofluorescência e imunoenzimático detectaram mais amostras positivas que o isolamento viral, entretanto, 15% das amostras positivas em cultura celular foram negativas na imunofluorescência, demonstrando a importância de se utilizar pelo menos dois métodos de diagnóstico. O mesmo foi observado por Funton & Middleton (1974), concluindo que o uso do isolamento em conjunto com a IF proporciona um aumento significativo do número de amostras positivas

diagnosticadas.

Métodos de biologia molecular como a RT-PCR (reação em cadeia por polimerase após transcrição reversa) e hibridação também tem sido utilizados para o diagnóstico do VSRH. Van Dyke e Murphy-Corb (1989) desenvolveram um ensaio de hibridação RNA-cDNA para a detecção do VSRH em secreções de nasofaringe. As amostras clínicas utilizadas haviam sido estocadas a -70°C e o ensaio não obteve a performance esperada, talvez pelo fato de o RNA ter sofrido degradação durante o congelamento e descongelamento das amostras.

Cubie *et al.* (1991) compararam o isolamento viral, a imunofluorescência direta e a hibridação *in situ* com sonda marcada com biotina (para os genes F e G), utilizando amostras frescas. Observaram que a imunofluorescência diagnosticou mais amostras positivas que os outros dois métodos.

A técnica de RT-PCR tem sido utilizada para o diagnóstico do vírus, principalmente quando a quantidade e o período de excreção são pequenos, como é o caso de pessoas idosas (Freymuth *et al.*, 1995; Gilbert *et al.*, 1996; Ong *et al.*, 2001; Pitkäranta *et al.*, 1998; Valdivia *et al.*, 1997). A RT-PCR também permite discriminar as amostras entre os tipos A e B (Gottschalk *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1996), sendo de grande utilidade para a análise genética das amostras. (Meteyard & Young, 1994; Peret *et al.*, 1998; Peret *et al.*, 2000).

Freymuth *et al.* (1995) utilizando iniciadores de regiões conservadas dos genes N ou NS2 do VSRH encontraram 97,5% de sensibilidade dos métodos de RT-PCR e hibridação em amostras de 80 culturas positivas de crianças hospitalizadas com infecção respiratória aguda.

Um trabalho realizado nos EUA concluiu que a RT-PCR, utilizando

iniciadores do gene F, foi razoavelmente sensível (73%) e mostrou uma especificidade de 99% (Falsey *et al.*, 2002). Em pacientes leucêmicos com pneumonia por vírus respiratórios, a *nested* RT-PCR mostrou uma eficiência melhor do que a cultura viral, *shell-vial* e o diagnóstico sorológico (van Elden *et al.*, 2002). Em nosso meio, segundo Vieira *et al.* (2001) a *nested* RT-PCR detectou cerca de 10% mais amostras positivas do que a IF, e diante disso, poderia ser considerada uma metodologia mais eficiente de diagnóstico. A imunofluorescência, contudo, apresentou maior praticidade, constituindo uma técnica mais rápida, com menos custos e facilmente executada em laboratórios que possuam instalações simples. Para a *nested* RT-PCR são necessárias instalações apropriadas e cuidados para que se possa evitar contaminações, para garantir um resultado positivo real e não fruto de uma contaminação. A única ressalva feita à IF é que a leitura, muitas vezes, é subjetiva, cansativa e depende da presença de uma pessoa experiente, o que requer tempo de treino.

Já existem estudos envolvendo novas tecnologias de biologia molecular, como a LC-RT-PCR (*LightCycler Reverse Transcriptase PCR*) desenvolvida pela *Roche Diagnostics*, que mostrou ser altamente específica e rápida. A LC-RT-PCR é uma tecnologia que transfere energia de ressonância fluorescente (FRET) para duas sondas de hibridação (Fluoróforo). Estas sondas são continuamente monitoradas no processo de amplificação dos *amplicons*, sendo por isso denominada de PCR em tempo real (Whiley *et al.*, 2002).

Outros métodos baseados na técnica de *RT-PCR* em tempo real têm sido descritos para a detecção genômica dos vírus, como Syber green, Taq Man, Lux, Scorpion (Borg *et al.*, 2003; Dewhurst-Maridor *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2003; Mackay

et al., 2002; van Elden *et al.*, 2003). Um estudo realizado em crianças com idade entre zero a três anos mostrou maior sensibilidade da PCR *multiplex* em tempo real para VSRH e vírus da Influenza A e B de aspirado de nasofaringe quando comparado ao teste de IF para a detecção de antígeno (*Directigen* – Becton Dickinson, Sparks, Md. E RSV *TestPack* – Abbott Laboratories, Abbott Park Ill) . Além disso, foi mais rápida quando comparada à RT-PCR (Boivin *et al.*, 2004). A PCR em tempo real diminui a manipulação de *amplicons*, evitando assim contaminação, é reprodutível e também pode ser utilizado para quantificar o ácido nucléico (Mackay *et al.*, 2002).

Quanto aos diagnósticos sorológicos, estes podem ser feitos pelas reações de neutralização e fixação de complemento, atualmente pouco utilizados pelo difícil trabalho. Também se pode realizar a determinação de imunoglobulinas classe específica (IgM e IgG), através da técnica de ELISA. O diagnóstico é feito com base no aumento de título entre as fases aguda e de convalescença. Pode ser realizado no soro, na saliva ou em aspirado de nasofaringe (Tristram & Welliver, 1996; Wilson *et al*, 2000). Contudo, a sorologia não permite o diagnóstico rápido da doença, já que os anticorpos só surgem após a fase aguda. Além disso, a sorologia apresenta valor limitado no diagnóstico de infecção primária em crianças menores de 6 meses de idade, pois 40% destas não apresentam aumento do título de anticorpos. Em adultos e crianças maiores, entretanto, a sorologia é considerada como um bom indicador de reinfecções (Cane, 2001).

O diagnóstico sorológico, portanto, não é o método mais adequado na da infecção aguda, tendo, entretanto, grande importância em estudos clínicos e epidemiológicos (Cox *et al*, 1998).

JUSTIFICATIVA

O presente estudo foi proposto, considerando-se que:

- VSRH é o patógeno predominante em doenças respiratórias de lactentes, podendo causar complicações pulmonares.
- No Brasil não existem estudos de coorte de VSRH para avaliar a incidência do VSRH em episódios de doença de vias aéreas.
- Estudos sobre a infecção aguda respiratória pelo VSRH em nosso meio são escassos e restritos a crianças com quadros infecciosos graves hospitalizadas ou atendidas em serviço de pronto atendimento.
- Apesar do isolamento viral ser considerado por muitos, como “padrão ouro” para o diagnóstico de infecção respiratória pelo VSRH, o advento de novas técnicas, como a detecção de antígeno com anticorpos monoclonais e a RT-PCR torna oportuno uma comparação destes com a técnica clássica do isolamento viral.
- Existem diferentes metodologias para o isolamento viral em cultura celulares. Essas diferentes metodologias demandam custos e quantidade de trabalho e tempo. A comparação da eficácia dessas diferentes metodologias pode contribuir para a escolha mais racional da que deva ser utilizada.

- O conhecimento das variantes antigênicas do VSRH circulantes em nosso meio se restringe a trabalhos realizados em crianças hospitalizadas ou atendidos em pronto socorro.

OBJETIVOS

2– OBJETIVOS

- Determinar a incidência de doença respiratória pelo VSRH (Vírus Sincicial Respiratório Humano) no 1º e 2º anos de vida em uma coorte de recém-nascidos no município de São Paulo.
- Comparar a sensibilidade do isolamento viral, detecção de antígenos específicos por anticorpos monoclonais e PCR para detecção do VSRH em secreção de nasofaringe de criança com sintomas de doença respiratória;
- Comparar as diferentes metodologias utilizadas para o isolamento do VSRH em culturas celulares;
- Fazer uma análise genotípica das amostras positivas para o VSRH, trazendo informações sobre as variantes genéticas que circularam em crianças da comunidade durante o período do estudo;

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 - DESENHO DO ESTUDO

Este estudo é uma coorte prospectiva, constituída por recém-nascidos, acompanhados por um período mínimo de cinco meses a dois anos de idade. O recrutamento foi realizado no período de dezembro de 2002 a abril de 2005 em maternidades públicas do município de São Paulo (Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, Hospital e Maternidade Vila Nova Cachoeirinha e Santa Casa de Misericórdia de São Paulo), com consentimento livre e esclarecido das mães e aprovação da comissão de Ética Médica das instituições envolvidas.

O presente estudo é um subprojeto de uma investigação mais ampla, que abordou os efeitos da poluição ambiental urbana e outros fatores relacionados à ocorrência de chiado na infância, através de um estudo de coorte de crianças, filhos de mães com antecedentes de asma ou de atopia na cidade de São Paulo (Projeto Chiado). A área de abrangência do Projeto Chiado consiste da zona Norte, zona Sul e zona Oeste.

3.2 - CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

➤ **Critérios de inclusão:**

Foram selecionados recém-nascidos para o estudo seguindo os critérios:

- Crianças aparentemente saudáveis, sem complicações ou infecções no período perinatal;
- Termo de consentimento assinado pelas mães.

➤ **Critérios de exclusão:**

Foram excluídos do estudo recém-nascidos que apresentavam:

- Suspeita de doenças hereditárias ou congênitas sintomáticas;
- Doenças neurológicas ou neuromusculares;
- História de disfunção respiratória grave ao nascer que tenha exigido intubação endotraqueal;
- Mães soropositivas para o HIV;
- Um ou ambos os pais dependentes de drogas ilícitas e
- Residência em favela.

Durante o seguimento, foram excluídas as crianças que apresentaram manifestações de:

- Doenças congênitas ou hereditárias;
- Doenças neurológicas ou neuromusculares;
- Doenças imunológicas;
- Tuberculose;
- Neoplasias e
- Mudança de endereço para local fora da área de abrangência do Projeto Chiado ou para favela.

3.3 - ASPECTOS ÉTICOS

O projeto conta com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - COEP (protocolo nº 615) e pela 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 (protocolo nº 1077/02) como um adendo ao Projeto de Pesquisa intitulado: “Poluição ambiental urbana e outros fatores relacionados à

ocorrência de chiado na infância: um estudo de coorte na cidade de São Paulo, Brasil”.

3.4 - COLETA DE DADOS

Os dados coletados encontram-se abaixo agrupados de acordo com a sua natureza:

➤ **AVALIAÇÃO CLÍNICA DAS CRIANÇAS E EXAMES LABORATORIAIS**

Os dados clínicos e o aspirado de nasofaringe foram coletados no Instituto da Criança, Hospital das Clínicas da FMUSP.

➤ **O ACOMPANHAMENTO DAS CRIANÇAS**

Os recém-nascidos foram recrutados na maternidade por enfermeiras que solicitaram o consentimento informado das mães para inclusão de suas crianças na pesquisa. Os dados relativos ao período perinatal foram obtidos nos registros hospitalares.

Essas crianças foram acompanhadas por pediatras da equipe envolvida na pesquisa (Projeto Chiado), com consultas regulares agendadas no Instituto da Criança do HC-FMUSP, da seguinte forma:

1. Consultas mensais até os 6 meses de idade;
2. Consultas bimestrais até 1 ano de idade;
3. Consultas trimestrais até 2 anos de idade.

Além das consultas regulares, todas as mães foram orientadas a trazer as crianças que, durante o seguimento, apresentassem episódios de doenças respiratórias do trato superior ou do trato inferior para serem examinadas por um pediatra da equipe da pesquisa. Os pacientes nesta situação foram submetidos à

coleta de aspirado de nasofaringe para pesquisa de vírus respiratórios.

Todas as mães que aceitaram participar deste estudo receberam um caderno de acompanhamento da saúde da criança. Este caderno funcionou como um incentivo à aderência às consultas e exames e como um registro de outras intercorrências de saúde que a criança possa ter apresentado em finais de semana, feriados ou quando procurou outro serviço médico por qualquer motivo.

Caso a criança apresentasse uma doença respiratória num final de semana ou feriado poderia procurar atendimento pelo pediatra da equipe da pesquisa no primeiro dia útil a seguir. Nesse caso, coletas para pesquisa viral foram realizadas se o evento teve início nos últimos 5 dias e se não houve outra coleta nos últimos 15 dias (intervalo mínimo entre as coletas para pesquisa de vírus respiratórios).

3.5 - ENTRADA E ANÁLISE DOS DADOS

➤ ANÁLISE DESCRITIVA

Foi calculada a taxa de incidência para doença respiratória pelo VSRH. As variações deste parâmetro segundo idade, sexo e estação do ano também foram descritos.

➤ ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação entre as taxas de positividade (sensibilidade) entre as técnicas para diagnóstico de VSRH foi usado o teste de Fisher's (Qui-Quadrado) com nível de significância estatística (p) de 0,05, utilizando-se o programa EPI Info 6.0, produzido pelo Center for Disease Control and Prevention (CDC). A sensibilidade do teste foi calculada com intervalo de confiança de 95% (IC_{95%}).

3.6 - MÉTODOS LABORATORIAIS

3.6.1 - COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas no Instituto da Criança – Hospital das Clínicas de São Paulo por técnico da área de enfermagem. As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP) da Universidade de São Paulo (USP) (LIM 52 HC – Faculdade de Medicina da USP).

A pesquisa de vírus respiratório foi feita em exsudatos de nasofaringe obtidos a partir de lavagem nasal. Para tanto, foram instilados em cada narina 2 ml de Ringer Lactato com sonda de silicone conectada a um sistema coletor para broncoscopia estéril (Simon®), e imediatamente aspirados. O procedimento foi repetido caso o volume aspirado fosse inferior a 2 ml. O tempo entre a coleta e o processamento da amostra não foi superior a 2 horas.

A definição dos casos a serem submetidos à coleta foi feita pelos pediatras envolvidos no atendimento das crianças ligadas ao estudo. Crianças com sintomatologia de infecção respiratória de início anterior foram incluídas, quando o período do início dos sintomas não ultrapassassem 5 dias.

3.6.2 - PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS:

Chegando ao laboratório, o material foi processado da seguinte maneira: No fluxo laminar, após assepsia e com o auxílio de uma pipeta Pasteur a amostra foi homogeneizada para soltar os grumos. Quando necessário, foi acrescentado cerca de 3 ml de PBS e novamente homogeneizado. A seguir as amostras foram separadas em 5 alíquotas: 250µl para RT-PCR, após acrescentar 750µl de Trizol LS (Gibco BRL®); 1200µl para inoculação em cultura de células; 800µl para detecção por imunocitoquímica e o restante da amostra armazenado em nitrogênio líquido.

3.6.2.1 - Linhagens Celulares

Foram utilizadas duas linhagens celulares para o isolamento viral, HEp2 (carcinoma epitelial de laringe humana) e NCI-292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano). As duas linhagens celulares foram cultivadas em meio Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®) acrescido de estreptomicina (100U/ml), gentamicina (100µg/ml) e anfotericina B (2µg/ml), sendo repicadas uma vez por semana em garrafas plásticas de 25 cm² com auxílio de uma solução de ATV (Tripsina, EDTA e Versene).

3.6.2.2 - Isolamento clássico-Tubos

Para o isolamento viral, 500 µl da amostra foram incubados com antibióticos e antifúngicos a 4°C por 1 hora. A seguir foram inoculados em tubos de 16mm de diâmetro contendo monocamada de células de linhagem epitelial Hep2 (2 tubos) e mucoepidermóide NCI-292 (um tubo) com uma confluência de 70 a 80%. Após adsorção por 1 hora a 33°C para Hep2 e a 37 °C para NCI-292 foi adicionado o meio de manutenção (Eagle com 2% de soro fetal bovino) Um dos tubos de Hep2 era mantido em estante com mecanismo responsável por movimento circular uniforme (ajustado para 1 volta por minuto) a 33°C e o outro tubo mantido em posição estacionária a 37°C. O tubo de NCI-292 foi mantido somente em posição estacionária a 37°C. Estes tubos foram lidos diariamente durante 10 dias, para observação de aparecimento de efeito citopático. Embora o efeito citopático do Vírus Sincicial Respiratório seja bastante característico (sincícios), frente ao aparecimento de qualquer outro efeito citopático, a confirmação diagnóstica foi feita com anticorpos monoclonais específicos para VSRH (IMAGEM DAKO®) e/ou por RT-PCR. A temperatura do isolamento viral em cultura celular para o VSRH

foi definida a partir de um estudo realizado no laboratório de virologia (LIM 52 do HC - FMUSP) onde ficou claro que a temperatura ideal é de 33°C em tubos estacionários.

Na ausência de efeito citopático para a linhagem celular Hep2, no décimo dia da inoculação, foi feita uma passagem cega. Os tubos assim repicados foram mantidos por mais dez dias, e, nos casos negativos, realizadas outra passagem cega. Para as amostras inoculadas em NCI-292 foram também realizados mais duas passagens com intervalos de 10 dias.

3.6.2.3 – Isolamento Clássico - Placas

Para o isolamento viral em placas, 600 µl da amostra foram incubados com antibióticos e antifúngicos a 4°C por 1 hora. A seguir, foram inoculados em placas com 24 cavidades (triplicata) contendo monocamada de células de linhagem epitelial (Hep2) e mucoepidermóide (NCI-292) com uma confluência de 70 a 80%. Após centrifugação por 30 minutos a 37 °C (Hughes, 1993) para adsorção, foram adicionados 500µl do meio de manutenção (Eagle com 2% de soro fetal bovino) e foram mantidas a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. As placas foram lidas diariamente durante 10 dias, para observação de aparecimento de efeito citopático, a confirmação diagnóstica foi feita com anticorpos monoclonais específicos para RSV (IMAGEM DAKO®) e/ou por RT-PCR.

Na ausência de efeito citopático, no décimo dia da inoculação, foi feita uma passagem cega. As placas assim repicadas foram mantidas por mais dez dias e nos casos negativos, realizada outra passagem cega.

3.6.2.4 - Imunofluorescência Direta

Para o preparo da lâmina para a pesquisa imunocitoquímica, quando

necessário, foi acrescentado ao lavado de nasofaringe o mucolítico N-acetilcisteína para diminuir a viscosidade do material, e novamente homogeneizado, acrescentado-se PBS aos poucos até o volume do tubo completar aproximadamente 10 ml, homogeneizando sempre. A seguir, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm, desprezado o sobrenadante e lavado mais duas vezes. O “*pellet*” obtido foi diluído em aproximadamente 200µl de PBS para constituir uma solução levemente turva.

Para o preparo da lâmina, 25 µl desta solução foram colocados em cada círculo da lâmina. Após secagem a temperatura ambiente, a lâmina foi fixada com acetona gelada por 10 minutos a 4 °C. Após evaporação da acetona, as lâminas foram embrulhadas em papel alumínio e estocadas no freezer a -20°C, por um período de 24 horas.

Para a reação imunocitoquímica foram seguidas as instruções do fabricante (DAKO®). Em cada círculo das lâminas previamente fixadas foi colocada uma gota do *pool* de anticorpos monoclonais para vírus respiratórios e as lâminas foram incubadas por 15 minutos a 37°C em câmara úmida. Após lavagem com PBS por 5 minutos e secagem das lâminas, foi adicionado o conjugado anti-IgG de camundongo com azul de Evans e feita a incubação por 15 minutos a 37°C. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas com PBS por 5 minutos e após secagem foram montadas com glicerina e lamínula para leitura em microscópio de campo escuro. Em seguida uma segunda etapa discriminatória foi realizada com os anticorpos monoclonais específicos (Influenza A, Influenza B, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3, VSRH e Adenovírus), quando houve presença de fluorescência no *pool*. Uma gota de cada anticorpo monoclonal foi aplicada em

cada poço e incubada por 15 minutos a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS por 5 minutos e após secagem foram montadas com glicerina e lamínula para leitura em microscópio de campo escuro.

3.6.2.5 - Reação em cadeia por polimerase (RT-PCR)

Amostras virais padrão

Foram utilizadas como amostras padrão de VSRH, as cepas A2 e CH18537, pertencentes aos grupos A e B, respectivamente. Estas amostras inoculadas em células Hep-2, cedidas pelo Prof. Dr. Edson Luiz Durigon do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, foram utilizadas como controles positivos para a reação de RT-PCR. Células Hep-2 não inoculadas com DNA e água *MilliQ* foram utilizadas como controles negativos para verificar a ocorrência de contaminação dos reagentes.

Extração do RNA com Trizol

A extração do RNA das amostras padrão e amostras clínicas foram realizadas a partir das alíquotas feitas em trizol LS no momento de distribuição do aspirado de nasofaringe, estocadas a -80°C.

O processo de extração foi todo realizado em banho de gelo. Foram adicionados 200µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) ao tubo de *ependorf* contendo 250µl da amostra de aspirado de nasofaringe e 750µl de Trizol. Os tubos foram homogeneizados, incubados por 5 minutos e centrifugados a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C, até a separação em duas fases. Em seguida, foram acrescentados 400µl de isopropanol gelado em tubos novos. Transferiu-se o sobrenadante (RNA) para os tubos contendo isopropanol gelado. Depois de

homogêinizado e incubado por 15 minutos, os tubos foram centrifugados novamente a 12000 por 15 minutos 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 800µl de etanol 75%. Após nova homogêinização, os tubos com as amostras foram centrifugados a 8000 rpm por 8 minutos a 4°C. Secou-se bem o *pellet*, descartando todo o sobrenadante. O RNA extraído foi ressuspensão em água DEPC (Dietilpirocarbonato) contendo 40U (unidades) de inibidor de Ribonuclease (*Rnasin*® - Promega Product). Posteriormente ao processo de extração foi realizada a síntese de cDNA.

Amplificação e Análise dos produtos amplificados

A detecção do VSRH presente nas amostras de lavado de nasofaringe dos lactentes foi feita através da RT-PCR. O protocolo de amplificação empregado, previamente publicado por Peret *et al* (1998), utiliza iniciadores (*primers*) complementares ao RNAm das glicoproteínas G e F. A localização de cada *primer* no genoma viral, a polaridade, a sequência e a utilização estão representados na Tabela 01 e esquematizados na Figura 02.

Tabela 01 – Relação dos *primers* utilizados para a RT-PCR, *semi nested* RT-PCR e seqüenciamento.

Utilização	Polaridade	Localização	Primer (Seqüência)	Referência
PCR(1ºround)	FV (-)	163-186 gp F	gttatgacactggtataccaac	Zheng <i>et al.</i> , 1996
	GAB (+)	504-524gp G	ycayttgaagtgttcaactt	Peret <i>et al.</i> , 2000
PCR(2ºround)	F1AB(-)	3-22 gp F	caactccattgttattgcc	Peret <i>et al.</i> , 1998
	GAB (+)	504-524 gp G	ycayttgaagtgttcaactt	Peret <i>et al.</i> , 2000
Seqüenciamento	F1AB(-)	3-22 gp F	caactccattgttattgcc	Peret <i>et al.</i> , 1998
	GAB (+)	504-524 gp G	ycayttgaagtgttcaactt	Peret <i>et al.</i> , 2000

Figura 02. Esquema do genoma viral (Os genes estão identificados de acordo com a proteína que codificam e estão listados logo abaixo do esquema viral. Os retângulos indicam a localização dos *primers*. Os tamanhos esperados dos produtos amplificados para cada uma das reações estão indicados à direita do esquema).

No caso de pesquisa de RNA, previamente à PCR, procedemos a etapa de transcrição reversa, usando *random primers* empregando o Kit de *High- Capacity cDNA Archive / Applied Biosystems*. A transcrição reversa foi realizada a 37°C por 2 horas em termociclador *Eppendorf*. O cDNA foi armazenado a -20°C.

A sequência foi amplificada numa reação com volume final de 50µl, contendo 5µl do cDNA, 50mM KCL, 10mM Tris, 8µl dNTPs (1,25mM), primers (10pmol de cada), MgCl₂ (1,5mM), 0,25µl *Taq* polimerase (2U/µl), gerando um fragmento de 653pb para o VSRH do tipo A e um fragmento de 656 pb para o tipo B. A amplificação foi realizada no termociclador *Eppendorf* com desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um deles composto de 1 minuto a 94 °C

para desnaturação do DNA molde, 1 minuto a 55 °C para o pareamento dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para a extensão. No final dos ciclos seguiu-se um aquecimento por 7 minutos de extensão final. Todas as reações de PCR realizadas incluíram controles negativos.

A detecção do produto amplificado foi realizada em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (45mM de Tris-Borato e 1mM de EDTA [pH 8.0]) e 0,5mg/ml brometo de etídeo. Uma mistura de 10µl da amostra e 2 µl de azul de bromofenol foi submetida à eletroforese em tampão TAE. A visualização do gel foi realizada em trans-iluminador de luz ultravioleta.

Para as amostras positivas por PCR, seguiu-se o seqüenciamento sem a necessidade de se fazer *semi nested* PCR.

A *semi nested* PCR foi feita utilizando-se 5µl do produto da primeira amplificação, nas mesmas condições descritas acima, substituindo-se o primer FV pelo F1AB (Tabela 01), gerando um fragmento de 486pb para o VSRH do tipo A e um fragmento de 492pb para o tipo B.

3.6.2.6 - Sensibilidade do teste (RT-PCR)

A sensibilidade do método foi avaliada através da clonagem do produto de PCR. Para tanto foi realizada a clonagem, em plasmídeo, do produto de PCR da amostra padrão A2, no Laboratório de Soroepidemiologia Imunobiologia Celular e Molecular do IMTSP, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Cotrim. Depois de purificado, o DNA do produto de PCR foi utilizado como inserto, e através da enzima *T4 DNA ligase* foi ligado ao vetor (*pGEM-T easy vector system*). Após um período de 3 horas de incubação a 15°C foi realizada a transformação em células altamente competentes, em colônias de *Escherichia. coli DH5a* semeadas em

meio *Luria – Bertani* (LB) a 37°C. A esse meio de cultura foi adicionado *XGal*, que se liga às colônias de bactérias onde não ocorreu a ligação do inserto, dando às mesmas coloração azul. As colônias foram então semeadas em placas e observou-se o crescimento de colônias brancas, indicando uma possível ligação do inserto com o vetor, e colônias azuis, onde não ocorreu a ligação do inserto. As colônias brancas isoladas foram semeadas em meio líquido para a extração do DNA. O DNA foi submetido à digestão enzimática para linearização do plasmídeo (enzimas *EcoRI*) e, após a realização de eletroforese em gel de agarose, observamos a presença de duas bandas com tamanhos correspondentes ao vetor (3.000pb) e ao inserto (653pb).

O DNA recombinante foi seqüenciado e titulado através da espectrofotometria, para o cálculo da sensibilidade do teste. A partir dessas quantificações, diluições seriadas foram feitas, levando a um limite de detecção de 100 cópias.

3.6.2.7 - Purificação dos produtos amplificados

A purificação da PCR e da *semi nested* PCR foi feita pelo *KitMicroconâ* (Millipore).

3.6.2.8 - Quantificação e Diluição do produto purificado

Foi preparado um gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (1X) contendo 0,5µl/ml de brometo de etídeo. Depois da polimerização do gel foram aplicados 5µl do produto purificado acrescido de 5µl do carreador (*loading buffer*). Nas extremidades do gel foram aplicadas 6µl e 3µl do peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Gibco), respectivamente. O gel foi analisado em luz ultravioleta e o produto foi diluído (Tabela 02) em água *MilliQ* autoclavada de acordo com a

intensidade da banda em relação ao Mass Ladder.

Tabela 02 – Diluição das amostras para seqüenciamento.

BANDA	DILUIÇÃO
> 100ng	Diluição 1/10
Entre 60-100ng	Diluição ¼
Entre 40-60ng	Diluição ½
Entre 20-40ng	Ajustar o volume para 60µl
< 20ng	Não há DNA suficiente p/ seqüenciar

3.6.2.9 - Seqüenciamento parcial do gene G do VSRH

Após a purificação e quantificação, as fitas de DNA foram seqüenciadas utilizando-se o kit “*ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*” (*Big Dye - Applied Biosystems, Inc., EUA*), de acordo com as instruções do fabricante.

Para tanto, foram utilizados os *primers* F1AB ,GAB e FV (Tabela 01) para o seqüenciamento das cepas do grupo A e B do VSRH. Cerca de 5µl, correspondendo a 30-90ng do produto amplificado, foram adicionados a um microtubo com 3,2 pmol de *primers*, 2µl do “*Terminator ready reaction Mix, Big Dye*”, 3µl do tampão de seqüenciamento (*Save money – Tris HCL 200mM {pH 9,0}* e 5mM de MgCl₂). A extensão enzimática foi realizada em termociclador *Eppendorf* durante 25 ciclos de 96°C por 10 segundos para a desnaturação do DNA molde, 50°C por 10 segundos para o anelamento dos *primers* e 60°C por 4 minutos para a extensão.

O produto obtido foi novamente purificado, visando à remoção de excesso

de didesoxinucleotídeos “terminadores” presentes na reação, através do método de precipitação com isopropanol a 75%, seguido de lavagem com etanol a 75%.

As amostras foram ressuspensas em uma solução de TSR (*Template Supression Reagent* – Applied Biosystems, Inc., EUA) e submetidas à eletroforese em polímero POP, utilizando seqüenciador automático *ABI Prism* modelo 377 (Applied Biosystems, Inc. EUA).

3.6.2.10 - Processamento e alinhamento das seqüências do gene G do VSRH

As seqüências de nucleotídeos foram analisadas com o programa *Sequence Navigator* versão 1.0 (Applied Biosystems, Inc., EUA), de modo a obter um seqüenciamento de 270 nucleotídeos correspondente à segunda região variável do gene codificador da glicoproteína G, designado como G2, que compreende os nucleotídeos 649-918 para o grupo A e 652-921 para o grupo B (Peret *et al.*, 1998). A seguir, essas seqüências foram traduzidas utilizando o programa Edit Seq™ 4,05 – *Expert Analysis Software* – DNASTar, Inc. para PC.

As seqüências de nucleotídeos, correspondentes à região G2, foram alinhadas em dois grupos, A e B, utilizando o programa Meg Align™ 4.05 - *Expert Analysis Software* – DNASTar, Inc. EUA para PC, tendo como resultado a obtenção do grau de similaridade entre as seqüências, calculadas par a par, o que possibilitou a identificação das seqüências de nucleotídeos idênticas (Botosso, 2002).

3.6.2.11 - Análise genotípica

Tendo como finalidade fazer uma análise genotípica das amostras de VSRH, trazendo informações sobre as variantes genéticas que circulam em lactentes da comunidade, as seqüências de nucleotídeos do grupo A foram

comparadas com outras 31 seqüências adquiridas no *GeneBank* , incluindo os protótipos A2 e *Long* e 29 seqüências representando os principais genótipos (GA1 a GA7) (Anexo A).

Já as seqüências de nucleotídeos do grupo B foram comparadas com outras 18 seqüências do grupo B, incluído os protótipos Ch18537 e 17 seqüências representando os principais genótipos (GB1 a GB4, SAB1 a SB3 E BA) (Anexo A).

3.6.2.12 - Análise da variabilidade de nucleotídeos e intragenótipos

Para a análise da variabilidade de nucleotídeos intragenótipos, as seqüências representantes de cada genótipo foram alinhadas e analisadas, separadamente, utilizando o programa Meg Align™ 4.05 - *Expert Analysis Software* – DNASTar, Inc. EUA para PC, tendo como resultado a obtenção do grau de similaridade entre as seqüências, calculado par a par.

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 - INCIDÊNCIA

No período de 16 de novembro de 2002 a 29 de abril de 2005 foram recrutados 270 recém-nascidos, 133 (49,25%) do sexo masculino e 137 (50,74%) do sexo feminino. Destes, 35 (12,96%) abandonaram o estudo em algum ponto. Dentre as 35 crianças desligadas da coorte após seu início encontram-se: desistências espontâneas, mudanças de endereço para fora da área de abrangência do Projeto Chiado e mudanças para a favela. As crianças foram acompanhadas por um período mínimo de 5 meses até 25 meses, com média de 13,5 meses. O número de recém-nascidos captados por ano, segue na Figura 03.

Figura 03. Número de crianças recrutadas anualmente para a coorte de recém-nascidos.

Das 270 crianças, 173 (64,07%) apresentaram pelo menos um episódio documentado de doença respiratória e colheram aspirados de nasofaringe. Destas 92 (53,2%) tiveram uma única amostra coletada e 81 (46,8%) foram submetidas a

2 ou mais coletas, sendo colhido um total de 316 amostras de secreção respiratória até 30 de setembro de 2005. O número de episódios respiratórios por criança variou de 1 a 8 com média de 1,8 amostras e mediana 4,5. Contudo, apenas duas crianças apresentaram um segundo episódio de infecção pelo VSRH.

Dentre os lactentes com doença respiratória 74/173 (42,77%) eram do sexo masculino ($p>0,05$).

O VSRH foi detectado em 11,3% (36/316) dos episódios de doença respiratória, em que foi colhido aspirado de nasofaringe. Das 36 crianças que apresentaram diagnósticos positivos para o VSRH 23 (63,9%) eram do sexo feminino e 13 (36,1%) do sexo masculino ($p<0,05$).

A taxa de incidência de doença pelo vírus sincicial respiratório humano na coorte foi de 9,84 casos de VSRH/ 1000 criança-mês.

As infecções respiratórias pelo VSRH ocorreram entre os meses de fevereiro a setembro, com picos de incidência nos meses de maio-junho, mostrando uma sazonalidade bem clara no outono-inverno (Figura 04, 05 e 06). Foram acometidas lactentes com idades entre 1 a 21 meses, com uma média de 6,39 meses e uma mediana de 5 meses.

Figura 04. Número de crianças com doença respiratória pelo VSRH no ano de 2003, mês a mês.

Figura 05. Número de crianças com doença respiratória pelo VSRH no ano de 2004, mês a mês.

Figura 06. Número de crianças com doença respiratória pelo VSRH no período de janeiro de a setembro de 2005, mês a mês.

4.2 - COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS PARA O DIAGNÓSTICO DO VSRH

Foram processadas para o estudo 316 amostras, coletadas de janeiro de 2003 a setembro de 2005, sendo que 36 amostras foram positivas para o VSRH por qualquer técnica. Uma amostra foi excluída da comparação de técnicas pelo isolamento viral, pois foi processada somente pela IF e RT-PCR. As outras 35 amostras foram processadas para três diferentes técnicas: pesquisa direta de antígenos do VSRH por IF com anticorpos monoclonais, isolamento viral em cultura celular e RT-PCR. A RT-PCR foi a técnica que apresentou maior sensibilidade, sendo positiva em 35/36 (97,2%) das amostras. A IF foi positiva em 25/36 (69,4%) dos casos positivos por qualquer técnica e o isolamento viral em 20/35 (57,2%) amostras ($p < 0,0001$). Em relação ao total de amostras examinadas, a positividade para o VSRH variou de 6,3% a 11,1%, de acordo com a técnica utilizada (Tabela 03) (Anexo B).

Tabela 03 – Proporção de amostras de aspirado de nasofaringe positivas e negativas para o VSRH pelas técnicas: RT-PCR, isolamento viral e imunofluorescência.

	RT-PCR	ISO	IFD
POS	35 (11,1%)	20 (6,3%)	25 (7,9 %)
NEG	281 (88,9%)	295 (93,7%)	291 (92,1%)
Total	316	315	316

IFD = imunofluorescência direta; ISO = isolamento viral; NEG = negativo; POS = positivo

Das 36 amostras clínicas positivas para o VSRH, 20 amostras (55,5%) foram positivas para as três técnicas realizadas. Quatro (11,1%) amostras foram positivas por IF e RT-PCR, 11 (30,5%) foram positivas apenas para a RT-PCR e uma (2,7%) apenas para a IFD. Das 29 amostras que puderam ser seqüenciadas e submetidas ao BLAST, todas 29 foram confirmadas como VSRH do grupo A ou B.

A similaridade entre as seqüências variou de 86 –100%. Das 29 seqüências analisadas, 23 (79,3%) não eram 100% similares. Contudo, observaram-se três conjuntos de seqüências idênticas entre si, um conjunto com quatro amostras, outro com três e outro com duas amostras. Nenhuma das amostras contidas nos conjuntos foi processada pelo PCR no mesmo dia.

Considerando a RT-PCR como “padrão ouro” frente aos resultados encontrados com esta técnica, observou-se que o isolamento viral, quando comparado a RT-PCR, mostrou uma sensibilidade de 58,8%, uma especificidade de 100%, VPP de 100% e VPN de 95,2% (Tabela 04).

Tabela 05 – Comparação da técnica de RT-PCR com o isolamento viral em

cultura celular para detecção de VSRH nas amostras de aspirado de nasofaringe.

RT-PCR			
ISO	Positivo	Negativo	Total
Positivo	20	0	20
Negativo	14	281	295
Total	34	281	315

ISO = isolamento viral; S = 58,8%, E = 100%, VPP de 100% e VPN de 95,2%

Com relação a IFD, observamos sensibilidade de 69,4%, especificidade de 99,6%, VPP de 96,0% e VPN de 96,2%, quando comparada à técnica de RT-PCR (Tabela 05).

Tabela 05 – Comparação da técnica de RT-PCR com a imunofluorescência para detecção de VSRH nas amostras de aspirado de nasofaringe.

RT-PCR			
IFD	Positivo	Negativo	Total
Positivo	24	1	25
Negativo	11	280	291
Total	35	281	316

IFD – imunofluorescência direta; S = 68,6%; E = 99,6%; VPP de 96,0% e VPN de 96,2%

4.2.1 - Diagnóstico do VSRH por isolamento em cultura de células

O isolamento viral em todas as 315 amostras foi executado mantendo os tubos em estantes com mecanismo responsável por movimento circular uniforme (*roller*).

Nas amostras coletadas a partir de janeiro de 2005 (n= 90) foi realizada

uma comparação quanto a diferentes metodologias do isolamento viral: isolamento em tubos utilizando *roller*, tubos estacionários, ou em placas. Frente ao total de amostras processadas no ano de 2005, com exceção de um caso, houve concordância entre as três técnicas de isolamento. Apenas uma das 20 amostras identificadas pelo isolamento viral (5%) foi positiva em placa (Tabela 06).

Tabela 06 – Resultados de diferentes técnicas de isolamento viral em culturas celulares (tubos utilizando *roller*, tubos estacionários e em placas) de casos positivos por qualquer técnica no ano de 2005.

Pacientes	VSRH	Roller	Estático	Placa
193-1	POS	NEG	NEG	NEG
201-1	POS	POS	POS	POS
204-1	POS	POS	POS	POS
202-1	POS	POS	POS	POS
225-1	POS	POS	POS	POS
220-1	POS	POS	POS	POS
15-10	POS	POS	POS	POS
64-1	POS	NEG	NEG	NEG
197-2	POS	NEG	NEG	NEG
102-5	POS	NEG	NEG	POS
113-5	POS	NEG	NEG	NEG
234-1	POS	POS	POS	POS

POS – positivo; NEG – negativo

Dentre as três técnicas comparadas, a técnica de isolamento viral em tubos utilizando *roller* foi a técnica que primeiro propiciou o aparecimento do efeito

citopático do VSRH, com uma média de 3 dias, enquanto o isolamento viral em placas ou em tubos estacionários teve uma média de 4,5 dias.

Com relação à eficiência das passagens cegas após primeira passagem negativa em cultivo, observouse que em 3/315 (1%) casos negativos na primeira passagem (T1), foi observada a presença de efeito citopático na segunda passagem (T2) e em outros três somente na terceira passagem cega (T3) (Tabela 07). Todas as outras 295 amostras processadas para o isolamento viral, inclusive as 16 amostras positivas por outras técnicas, mantiveram resultados negativos, apesar de terem sido realizadas duas passagens cegas. Desta forma, a utilização de duas passagens cegas elevou a taxa de positividade dos isolamentos em 30% (6/20). Em relação à positividade, frente ao total de amostras processadas, as passagens cegas elevaram a taxa de positividade nos isolamentos em culturas celulares de 14/315 (4,4%) para 20/315 (6,3%).

Tabela 07 – Resultado das passagens cegas do inóculo em amostras de aspirado de nasofaringe de casos com isolamento positivo para o VSRH em culturas celulares.

Pacientes	T 1	T 2	T 3
1-6	NEG	NEG	POS
6-2	POS	-	-
15-10	POS	-	-
38-2	POS	-	-
54-1	NEG	POS	-
56-1	POS	-	-
60-1	POS	-	-
65-1	NEG	POS	-
66-1	POS	-	-
68-1	POS	-	-
75-1	POS	-	-
76-1	NEG	NEG	POS
96-1	NEG	NEG	POS
102-1	POS	-	-
201-1	POS	-	-
202-1	POS	-	-
204-1	POS	-	-
220-1	NEG	POS	-
225-1	POS	-	-
234-1	POS	-	-

POS – Positivo; NEG – Negativo; T – passagem cega

Em relação às linhagens celulares empregadas, observou-se que somente uma (5%) das 20 amostras positivas no isolamento viral foi positiva para o VSRH na linhagem celular NCI-292. Esta amostra foi negativa na linhagem celular Hep2. Frente a estes resultados, a partir de junho de 2005, as amostras não foram mais

processadas para o isolamento utilizando a linhagem celular NCI-292 (Tabela 08).

Tabela 08 – Resultado do isoalmeto viral do VSRH nas linhagens celulares Hep2 e NCI-292 em amostras de aspirado de nasofaringe com isolamento viral positivo por qualquer linhagem.

Pacientes	Hep2 (ECP)	NCI-292 (ECP)
1-6	POS	NEG
6-2	POS	NEG
15-10	POS	NEG
38-2	POS	NEG
54-1	POS	NEG
56-1	POS	NEG
60-1	POS	NEG
65-1	POS	NEG
66-1	POS	NEG
68-1	NEG	POS
75-1	POS	NEG
76-1	POS	NEG
96-1	POS	NEG
102-1	POS	NEG
201-1	POS	NEG
202-1	POS	NEG
204-1	POS	NEG
220-1	POS	NEG
225-1	POS	NEG
234-1	POS	NEG

Hep2 – Carcinoma epitelial de laringe humano,

NCI-292 – carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano

EPC – efeito citopático; POS – Positivo; NEG – Negativo

4.3 – Caracterização Molecular

Foram seqüenciadas 29 amostras das 35 positivas pela técnica de RT-PCR. Uma amostra não tinha material suficiente e das outras 5 amostras não

foram obtidas seqüências capazes de formar um *contig*, impedindo o alinhamento e análise das mesmas.

4.3.1 – Análise da variabilidade de nucleotídeos intragenótipos

O alinhamento entre as seqüências de nucleotídeos correspondentes à região G2 do da glicoproteína G do VSRH, grupos A e B, estão representados nas ANEXO C e D. Não foram verificadas inserções ou deleções nas amostras estudadas do grupo A. Contudo do grupo B verificou-se uma inserção de 60 nucleotídeos em 6 das 7 amostras identificadas neste grupo.

A similaridade entre as seqüências de nucleotídeos do grupo A variou de 88,6 a 100%, sendo identificados 3 conjuntos de seqüências idênticas (Anexo G). Entre as amostras do grupo B a porcentagem de identidade variou de 86,7 a 99,7%, não sendo identificados nenhum conjunto de seqüências idênticas. (ANEXO H).

Em ambos os grupos foram verificados que as menores porcentagens de identidade ocorriam quando as amostras eram comparadas aos protótipos.

4.2 – Análise genotípica

- **Grupo A**

As 21 seqüências do grupo A foram comparadas com outras adquiridas do *GenBank*, descritas no item 3.6.2.11. Foram encontrados dois genótipos circulando no ano de 2004 e 2005 concomitantemente, GA2 e GA5 (Tabela 09). A topologia da árvore proposta pode ser visualizada no ANEXO E.

- **Grupo B**

As 9 seqüências do grupo B foram comparadas com outras adquiridas do *GenBank*, descritas no item 3.6.2.11. Foram encontrados o genótipo emergente

(BA) e o genótipo SAB1 (Tabela 09). A topologia da árvore proposta pode ser visualizada no ANEXOF.

Tabela 09 – Distribuição dos genótipos de VSRH, grupos A e B, nos anos de 2004 e 2005 em uma coorte de recém-nascidos com doença respiratória.

GENOTIPOS					
	GRUPO A	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO B	
ANO	GA2	GA5	SAB1	BA	TOTAL
2004	7	7	-	1	15
2005	3	4	1	6	14
TOTAL	10	11	1	7	29

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

No presente estudo, o VSRH mostrou ser uma importante causa de doença respiratória em lactentes, tanto sida detectada em 11,4% dos episódios analisados.

A taxa de incidência de doença respiratória pelo VSRH em lactentes no presente estudo foi de 9,84 casos/1000 crianças-mês. Em um trabalho realizado Salvador, Brazil por Souza *et al* (2003) teve uma taxa de incidência geral de 7.66 episódios/ 1000 crianças-dias para qualquer vírus respiratório, sendo que o VSRH foi identificado em apenas 4% dos casos positivos. Iwane *et al* (2004), tiveram uma taxa de prevalência de infecção pelo VSRH de 13 por 1000 crianças hospitalizadas na faixa etária menor de 1 ano de idade, 3 casos/1000 em crianças de 1 ano de idade e de 0,4 casos/1000 em crianças hospitalizadas de 2 a 5 anos de idade. Durante o ano de 2003 tivemos somente um caso em nossa coorte. Atribuímos este achado ao pequeno número de lactentes recrutados no surto do respectivo ano e também à baixa circulação do vírus naquele ano.

Infecções respiratórias virais com manifestações clínicas leves ou assintomáticas podem ter passado despercebidos pelas mães ou responsáveis dos lactentes, subestimando a taxa de incidência, ocasionando assim um viés de seleção. Apesar disto, no presente estudo, o VSRH mostrou ser uma importante causa de doença respiratória em lactentes, concordando com os dados da literatura realizados em países desenvolvidos e em alguns países em desenvolvimento, que consideram esse agente o principal patógeno viral da via aérea inferior em crianças (Ávila *et al.*, 1990; Miyao *et al.*, 1999; Nascimento *et al.*, 1991). Um estudo realizado por Weber *et al.* (1998) avaliou 4 epidemias de VSRH

em Gâmbia, na África. Neste país o VSRH também se mostrou um agente importante das infecções do TRI dos lactentes, com impacto significativo na morbidade e letalidade e nos custos de saúde pública, principalmente quando há necessidade de oxigenoterapia.

Constatou-se ainda que o VSRH foi encontrado durante os três anos de estudo no outono e inverno. No Brasil, dados semelhantes em relação ao padrão sazonal do VSRH são demonstrados no Rio de Janeiro por Nascimento *et al.* (1991) e Suttmoller *et al.* (1995) e em São Paulo por Botosso (2002), Diniz (1999), Hein (1997) e Vieira *et al.* (2001).

Em nosso estudo, houve uma associação entre infecção viral pelo VSRH e o sexo feminino, sendo que o recrutamento quanto ao sexo foi equilibrado. Estes dados diferem dos encontrados por Hein (1997) e Vallada (1996), que não constataram associação entre infecção viral e sexo. Por sua vez, outros autores verificaram predomínio do sexo masculino (Glezen *et al.*, 1981; Holberg *et al.*, 1991; Vieira *et al.*, 2001). Não pudemos encontrar uma explicação lógica para a predominância do sexo feminino no presente estudo, já que o número de crianças recrutadas e o tempo de acompanhamento não foram diferentes nos dois grupos.

É importante analisar a faixa etária das crianças nos diversos estudos, pois é aceito que quanto menor a idade dos pacientes, maior será a frequência de identificação do VSRH. No presente estudo, verificou-se que a mediana dos lactentes com diagnóstico positivo para VSRH foi de 5 meses e a média de 6,39 meses. Um estudo de coorte realizado por Miyao *et al.* (1999) em crianças internadas na cidade de São Paulo mostrou que 2/3 dos pacientes nos quais em foi detectado o VSRH tinha idade inferior a 6 meses, o que diferiu do subgrupo

sem VSRH. Naquele estudo, a mediana de idade do subgrupo com VSRH foi de 3 meses e do subgrupo sem VSRH foi de 13 meses.

Estima-se que epidemias causadas pelo VSRH afetam anualmente 10-20% da população com menos dois anos de idade. Dentro deste grupo aproximadamente 20% são hospitalizados devido à gravidade da doença ou pela pouca idade da criança. Nos imunocomprometidos, a infecção por VSRH está associada à morbidade e mortalidade significantes (Collins *et al*, 2001). O VSRH é também um importante agente de infecção nosocomial (Hall *et al*, 1975), sendo muito infeccioso quando aplicado diretamente na mucosa ocular ou nasal por mãos ou objetos contaminados (Falsey & Walsh, 2000; Tristam & Welliver, 1995). Estes dados mostram a importância de se dispor de rápidos e eficazes métodos de diagnóstico laboratorial, já que estudos recentes enfatizam o impacto do tratamento precoce na evolução clínica das mesmas (Barenger *et al.*, 2000; Hall, 2001).

Contudo, apesar de novas técnicas terem sido descritas nos últimos anos, o isolamento viral continua sendo considerado o padrão ouro para a detecção de VSRH em secreções respiratórias (Collins *et al.*, 2001).

O VSRH cresce em uma variedade de linhagens celulares, porém é mais bem cultivado em células epiteliais humanas. A linhagem celular considerada mais eficiente para o isolamento e a propagação do VSRH é a Hep2 (Falsey, 2000; Tristam & Welliver, 1995). Hierholzer *et al.* (1993) demonstraram que a linhagem NCI-H292, originalmente derivada de um carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano, também é sensível e poderia ser usada satisfatoriamente para o isolamento do VSRH. Em um estudo realizado com diferentes linhagens mostrou

que uma combinação de linhagens celulares para o isolamento do VSRH é mais eficiente do que a utilização de somente um tipo de linhagem celular. Assim foi demonstrado que a utilização de três linhagens celulares leva a taxa de 95% de sensibilidade e de duas linhagens à taxa de 90%. Contudo, estes números são obtidos quando há presença das células Hep-2 entre as linhagens para o isolamento do VSRH (Arens *et al.*, 1986). Em nosso estudo, embora com sensibilidade menor que a descrita por outros autores, a linhagem celular Hep2 foi mais eficiente para o isolamento do VSRH. Entretanto, não pudemos observar um aumento expressivo na sensibilidade do isolamento viral quando avaliamos a linhagem Hep2 individualmente (55,9%) ou em associação com a NCI-292 (58,8%). Na verdade, somente um caso dos 20 positivos do isolamento viral foi positivo em célula NCI-292. A explicação para este fato pode estar relacionada à utilização de células com alto número de passagens ou por contaminação da linhagem celular NCI-292 por certos agentes como, por exemplo, pelo *Mycoplasma*. Sabe-se que as linhagens celulares podem perder a capacidade de propagação do efeito citopático viral na cultura, necessitando de freqüente monitoramento (Bromberg *et al.*, 1991). Em nosso estudo não foi feito monitoramento regular para estes dois eventos, o que pode explicar o baixo rendimento dos isolamentos na linhagem celular NCI-292. É também importante salientar que muito embora o vírus cresça em uma variedade de linhagens celulares, acredita-se que a presença e intensidade do efeito citopático e o título viral podem variar com a cepa viral, as condições das células, e também com as características do paciente. Assim, títulos maiores que 10^7 PFU/ml são difíceis de serem obtidos, principalmente em amostras isoladas de adulto, já que a excreção

neste grupo é baixa (até 10^3 PFU/ml) e de curta duração (de 3 a 4 dias). Por isso, a sensibilidade do isolamento viral nesta população é baixa. Já em crianças, a excreção do vírus é alta (em torno de 10^6 PFU/ml) e com uma duração de 21 dias em crianças hospitalizadas com comprometimento do trato respiratório inferior (Hall *et al.*, 1975). Eventualmente, a gravidade da infecção poderia influenciar na taxa de isolamento, já que cargas virais maiores são esperadas em casos mais graves. Vários outros fatores poderiam interferir na eficácia do isolamento. Dentre estes, destaca-se, por exemplo, às condições de coleta e o manuseio das amostras. O VSRH é um vírus termolábil, necessitando de condições adequadas para o transporte, como transporte rápido (entre 1 a 2 horas após a coleta) e a 4°C , pois a titulação do vírus na amostra clínica pode cair rapidamente à temperatura ambiente (Englund *et al.*, 1996; Falsey & Walsh, 2000). Um estudo observou uma redução de 90% no título viral após 2 horas de coleta (Hall *et al.*, 1975). Alguns trabalhos sugerem que as amostras virais podem permanecer a 4°C de 3 a 5 horas e depois devem ser estocadas a -70°C , podendo ainda assim permanecer viáveis (Hall *et al.*, 1975; Kellogg, 1991). No presente trabalho, mesmo que as amostras tenham sido transportadas e inoculadas em menos de 2 horas, a baixa frequência do isolamento viral em relação a imunofluorescência ou a PCR, técnicas que independem da capacidade infectante do vírus, sugere que a labilidade do vírus pode ter afetado a taxa de isolamento em culturas celulares. A técnica de coleta é fundamental, independente do material utilizado. No geral, o lavado nasal permite um aumento significativo na detecção dos vírus respiratórios quando comparado com os *swabs* de nasofaringe e de garganta, para qualquer técnica (Kellogg, 1991). A visualização do efeito citopático em culturas de células

pode ser difícil também pelo fato das células mais eficientes para o isolamento do VSRH, como a Hep2, crescerem formando mais de uma camada celular (Bromberg *et al.*, 1991). Atualmente a cultura viral mesmo, com efeito, citopático característico para o VSRH é confirmada por imunofluorescência, geralmente com anticorpos monoclonais comerciais (van Elden *et al.*, 2002), o que foi realizado no presente estudo.

Tem sido relatado que a utilização do *roller* no isolamento viral otimizaria o aparecimento do efeito citopático para o VSRH (Hughes, 1993). A centrifugação da placa de cultura após inoculação do material clínico também poderia aumentar a eficiência do isolamento, por facilitar a adsorção do vírus na linhagem celular (Hughes, 1993). Em nosso estudo não houve diferença entre o isolamento em tubos *roller versus* tubos estacionários ou de tubos *versus* placas. Esta informação nos parece relevante, já que a técnica de tubos *roller* envolve utilização de equipamento especial, que nem sempre é disponível, além de exigir calibragem e manutenção. Em relação à utilização de tubos ou placas, nossos resultados mostraram resultados equivalentes, sugerindo que a escolha de um ou outro método dependeria mais da “expertise” de cada laboratório nestas técnicas.

A visualização do efeito citopático em cultura de células pode ser difícil tanto pelas condições de cultivo que pode não ser adequada para a formação do sincício, como pelo fato das células Hep2 (heterodiplóide) crescerem formando mais de uma camada celular, portanto necessitando da realização de passagem cega (Bromberg *et al.*, 1990). De acordo com Brandt (1979), o efeito citopático do VSRH pode ser melhor visualizado quando há transferência do inóculo para um novo tubo de Hep2 (passagem cega). Embora a passagem cega para o VSRH

seja realizada em diversos laboratórios, há poucos dados na literatura sobre sua real eficácia. Em nosso estudo foram realizadas duas passagens cegas para a renovação da camada celular e fornecimento de nutrientes ao vírus através da troca do meio de cultivo. As passagens cegas, no presente trabalho, elevaram a taxa de positividade em 30% nos isolamentos e de 4,4% para 6,3% no computo geral. Considerando o custo e o trabalho envolvido, este procedimento parece-nos altamente questionável em termos de custo-benefício na rotina diagnóstica. Contudo em situações em que a obtenção do isolamento de vírus é crucial, como para a realização de testes de resistências, estudos genéticos entre outros, a passagem cega poderia ser justificada.

Além da menor sensibilidade, o isolamento viral, é uma técnica mais demorada frente a IF ou a RT-PCR. Com a inclusão de duas passagens cegas os resultados do isolamento só estariam disponíveis após aproximadamente 21 a 30 dias, o que torna esta técnica inadequada para o diagnóstico de rotina do VSRH, especialmente em pacientes que claramente se beneficiam de intervenções terapêuticas precoces.

Em contrapartida, a técnica de imunofluorescência (IF) é largamente utilizada para detectar o VSRH em células epiteliais de nasofaringe ou para a confirmação do isolamento viral em cultura celular. Este teste é um método rápido e de fácil execução quando comparado ao isolamento, o que resultou em menor tempo de trabalho. Outra vantagem é que a presença de bactérias ou até mesmo de enterovírus na amostra não interfere na técnica. Nossos resultados mostraram que a IF teve uma boa sensibilidade, próxima a PCR. Entretanto, a técnica exige uma amostra rica em células, boas condições de transporte da mesma e um

profissional familiarizado com a leitura em microscópio de imunofluorescência (Fulton & Middleton, 1974; Tristram & Welliver, 1995; Waris, 1991).

Segundo alguns autores, o uso do isolamento em conjunto com a IF proporciona um aumento significativo do número de amostras positivas, sugerindo a importância de se utilizar pelo menos dois métodos de diagnóstico (Fulton & Middleton 1974). No presente estudo, a associação do isolamento viral não teve impacto na sensibilidade do diagnóstico uma vez que a imunofluorescência detectou todas as amostras que foram positivas pela técnica de isolamento viral.

A técnica de RT-PCR tem sido utilizada para o diagnóstico do VSRH, principalmente quando a quantidade e o período de excreção do vírus são pequenos. (Freymuth *et al.*, 1995; Gilbert *et al.*, 1996; Ong *et al.*, 2001; Pitkäranta *et al.*, 1998; Valdivia *et al.*, 1997) No presente estudo, observamos que a *nested* RT-PCR mostrou uma sensibilidade superior a cultura viral e a imunofluorescência, a exemplo do que foi observado em outros estudos (Rovida *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2001; van Elden *et al.*, 2002; Weinberg *et al.*, 2004;). Em nosso estudo as amostras positivas para o VSRH na PCR foram confirmadas através do seqüenciamento (BLAST), descartando assim a possibilidade de inespecificidade da técnica. A contaminação intralaboratorial das amostras com “amplicons”, por sua vez, foi até certo ponto, descartada através do alinhamento entre as seqüências de nucleotídeos correspondentes a região G2 do gene codificador da glicoproteína G do VSRH, grupos A e B. Diferenças pontuais de bases entre as amostras estudadas foram observadas em 79,3% das amostras, e nenhuma das amostras contidas nos três conjuntos idênticos entre si foi processada no mesmo dia para a PCR. Por outro lado, estes conjuntos diferiam do

controle positivo, excluindo a possibilidade de contaminação com esta cepa. Portanto, ainda que a ocorrência de contaminação intralaboratorial não possa ser totalmente afastada, os dados de alinhamento e similaridade dos nucleotídeos tornam esta hipótese remota.

Para o diagnóstico rápido e sensível do VSRH, a escolha da técnica é de suma importância. Tanto no controle da disseminação da infecção pelo VSRH em ambiente hospitalar como para a introdução precoce de antiviral quando indicado, a implementação de técnicas como a *nested* RT-PCR e a IF são de extrema importância. Os dados do presente estudo sugerem ainda que o conceito de isolamento viral como “padrão ouro” no diagnóstico do VSRH seja revisto uma vez que a RT-PCR e a IF têm se mostrados mais eficientes para este fim.

Outro aspecto abordado no presente trabalho foi à caracterização molecular das amostras positivas pela técnica de RT-PCR.

A caracterização molecular em grupos e subgrupos do VSRH circulantes em determinada região constitui dados epidemiológicos importantes, tendo em vista que a variabilidade entre cepas do VSRH poderia eventualmente contribuir para a ocorrência de infecções de maior ou menor gravidade, e explicar porque o mesmo pode produzir infecções repetidas e causarem surtos anuais (Anderson *et al.*, 1985; Hendry *et al.*, 1986). Estudos de seqüenciamento identificaram numerosos variantes antigênicos dentro de cada subgrupo (Cane *et al.*, 1994; Frabisele *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 1994; Moura *et al.*, 2004; Peret *et al.*, 1998; Peret *et al.*, 2000). Alguns desses estudos multicêntricos, demonstraram co-circulação de genótipos distintos durante o mesmo surto com alternância no predomínio de alguns que já haviam circulado em anos anteriores, na mesma

comunidade.

No presente estudo realizamos a análise da variabilidade genética do VSRH de amostras de crianças ambulatoriais do projeto Chiado, durante 2 anos consecutivos, 2004 e 2005. A região G2 foi escolhida por se tratar de uma região variável dentro do gene G (Peret *et al.*, 1998).

Nas 29 amostras seqüenciadas, foram encontrados 2 genótipos dentro do grupo A e 2 dentro do grupo B., co-circulando aleatoriamente nos surtos estudados. Diferentes genótipos co-circularam a cada ano, com predominância de um ou dois genótipos por ano, como GA2 e o GA5 do grupo A no ano de 2004 e o BA do grupo B no ano de 2005. A circulação do GA2 e do GA5 predominante no ano de 2004, declinou no ano seguinte.

Vários estudos descreveram a alternância de genótipos predominantes, com aumento de circulação de alguns genótipos e o declínio de outros no decorrer dos anos (Cane *et al.*, 1994; Choi & Lee, 2000; Peret *et al.* 2000; Seiki *et al.*, 2001), ou até mesmo o surgimento de um novo genótipo (Venter *et al.*, 2001).

Dados da literatura descreveram que os genótipos GA2 e GA5 dentro do grupo A foram predominantes nos últimos anos, mas os genótipos GA1 e GA7 também circularam. Já do grupo B predominou o genótipo GB3 (Frabasile *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2004; Viegas & Mistchenko, 2005; Zlateva *et al.*, 2004). No Brasil, Moura *et al.* (2004) identificaram diferentes genótipos, incluindo o genótipo BA na cidade de Salvador no ano de 1999.

De modo geral, quando se compara à alternância de genótipos do grupo A com o grupo B, observa-se que este último é relativamente mais estável, com apenas um genótipo circulando durante os surtos. Alguns estudos têm sugerido

inclusive que a menor variabilidade entre as amostras do grupo B explica a predominância do grupo A (Botosso 2002; Choi & Lee, 2000; Coggins *et al.*, 1998). Contudo, no presente estudo, verificamos que no ano de 2005 houve uma inserção de 60 nucleotídeos em um genótipo do grupo B, levando a um predomínio deste novo genótipo, denominado BA. Recentes publicações têm demonstrados a emergência deste novo genótipo do VSRH do grupo B, com a inserção de 60 nucleotídeos. Até o presente momento este novo genótipo só tem circulado na América do Sul e Nordeste da Ásia. O mecanismo de como ocorre esta inserção ainda é desconhecida, mas até o momento este novo genótipo não foi associado a um comportamento epidemiológico ou patogênico diverso do observado com os outros genótipos do grupo B do VSRH (Nagai *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004; Trento *et al.*, 2003; Venter *et al.*, 2001).

Contudo, esta alternância de genótipos no decorrer dos anos pode proporcionar uma evasão da resposta imune previamente existente e, conseqüentemente, facilitar a transmissão viral (Garcia *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 1999). Em nosso estudo ocorreram dois casos de reinfecção pelo VSRH. Num deles a criança teve duas infecções do grupo A, uma o genótipo GA2 e outra o genótipo GA5. Já no outro caso, a criança teve infecção pelo genótipo GA2 do grupo A e uma segunda infecção com o genótipo BA do grupo B.

CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

- O VSRH mostrou ser uma importante causa de doença respiratória em lactentes da comunidade do município de São Paulo, com incidência de 9,84 casos/1000 criança-mês no período do estudo.
- A técnica de RT-PCR mostrou ser mais sensível que a imunofluorescência e o isolamento viral para a detecção do VSRH em amostras de lavado de nasofaringe com doença respiratória.
- As três metodologias utilizadas para o isolamento viral do VSRH (cultura em tubos estacionários, *roller* e placas) mostraram a mesma sensibilidade, sugerindo que o método a ser utilizado dependeria da conveniência e experiência de cada laboratório.
- A genotipagem mostrou a existência de vários genótipos circulando concomitantemente, com aumento de circulação de alguns genótipos e o declínio de outros no período do estudo. Em 2005 documentou-se a circulação de um genótipo emergente (BA).

ANEXO

ANEXO A – Amostras adquiridas do *GenBank*:

- Grupo A

Genótipo GA1 – CH34 – Código – AF65257

NY108 – Código – AF233917

MO48 – Código – AF233914

AL19471-5 – Código – AF233902

Genótipo GA2 – AL19376-1 – Código – AF233900

CH57 – Código – AF065258

CH28 – Código – AF065256

TX69564 – Código – AF233923

MO55 – Código – AF233915

Genótipo GA3 – TX68481 – Código – AF233920

TX68532 – Código – AF233921

MO16 – Código – AF233913

MO13 – Código – AF233911

CN395 – Código – AF233905

Genótipo GA4 – CH09 – Código – AF065254

Genótipo GA5 – CN3114 – Código – AF233908

AL19556-3 – Código – AF233903

CH17 – Código – AF065255

TX69343 – Código – AF233922

NY103 – Código – AF233916

TX67951 – Código – AF233919

MO15 – Código – AF233912

CN2708 – Código – AF233906

MO01 – Código – AF233909

Genótipo GA6 – NY20 – Código – AF233918

AL19452-2 – Código – AF233901

Genótipo GA7 – MO02 – Código – AF233910

CN2851 – Código – CN2851

CN1973 – Código – AF233904

Genótipo SAV1 – SA97D669 – AF348809.1

SA98D707 – AF348810.1

- Grupo B

GB1 – CH10b – Código – AF065251

GB2 – CH939b – AF0652251

GB3 – NY97 – Código – AF233932

MO53 – Código – AF233930

MO35 – Código – AF233929

CN521 – Código – AF233927

AL19794-1 – Código – AF233925

TX69208 – Código – AF233933

GB4 – AL197334-4 – Código – AF233924

NY01 – Código – AF233931

CN1839 – Código – AF233926

MO30 – Código – AF233928

SAB1 – SA0025 – AF348825

SA98D1656 - AF348826

SAB2 – SA99V1325 – AF3488260

SA99V800 – AF3488261

SAB3 – SA0028 – AF348812

SA99V800 – AF348821

BA – BA3833/99B – AY660681

BA4128/99B – AY333364

Padrão – M17231 – Ch18537

M17212 – Long

X03149 – A2

Anexo B – Resultado da comparação das técnicas utilizadas no estudo.

Pacientes	ISO	PCR	IFD
4-2	ND	POS	POS
44-1	NEG	NEG	POS
48-1	NEG	POS	POS
6-2	POS	POS	POS
54-1	POS	POS	POS
60-1	POS	POS	POS
65-1	POS	POS	POS
66-1	POS	POS	POS
38-2	POS	POS	POS
68-1	POS	POS	POS
1-6	POS	POS	POS
22-4	NEG	POS	NEG
75-1	POS	POS	POS
77-2	POS	POS	POS
124-2	NEG	POS	NEG
15-5	NEG	POS	NEG
56-1	POS	POS	POS
84-1	POS	POS	POS
31-2	NEG	POS	NEG
96-1	POS	POS	POS
193-1	NEG	POS	NEG
201-1	POS	POS	POS
204-1	POS	POS	POS
202-1	POS	POS	POS
225-1	POS	POS	POS
220-1	POS	POS	POS
15-10	POS	POS	POS
64-1	NEG	POS	NEG
197-2	NEG	POS	NEG
102-5	POS	POS	POS
113-5	POS	POS	NEG
234-1	POS	POS	POS
114-4	NEG	POS	POS
151-3	NEG	POS	NEG
75-7	NEG	POS	NEG
256-1	NEG	POS	NEG

IFD – imunofluorescência direta; ISO – isolamento viral; NEG – negativo; POS- positivo

	G	A	A	A	A	G	C	C	A	A	C	C	A	T	C	A	A	C	A	T	C	A	C	C	A	A	A	C	C	A		Consenso				
	70												80										90													
	-----+-----+-----+-----																																			
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP36				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	IMTSP13				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	IMTSP17				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	IMTSP05				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP06				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	IMTSP29				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP27				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	IMTSP08				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP09				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP14				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	IMTSP20				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	IMTSP16				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP34				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP11				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	IMTSP12				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP04				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP18				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP19				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP22				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	IMTSP21				
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	IMTSP30				
61	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	A2				

	A	A	C	A	T	C	A	G	A	A	C	T	A	C	A	C	T	G	C	T	C	A	C	C	T	C	C	A	G	T		Consenso				
	100												110										120													
	-----+-----+-----+-----																																			
91	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	A	.	.	.	IMTSP36					
91	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	IMTSP13				
91	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	IMTSP17					
91	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	IMTSP05					
91	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	IMTSP06					
91	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	IMTSP29					
91	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	IMTSP27					
91	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	IMTSP08				
91	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	IMTSP09					
91	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	IMTSP14					
91	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	IMTSP20				
91	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	IMTSP16				
91	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	IMTSP34				
91	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	IMTSP11					
91	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	IMTSP12				
91	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	IMTSP04					
91	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.												

ANEXO C - continuação

	C	C	A	T	C	C	A	A	C	A	C	A	A	C	A	G	A	C	C	A	G	T	A	G	T	C	A	T	T	A	Consenso
	-----+-----+-----+-----																														
	250												260												270						
	-----+-----+-----+-----																														
241	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP36
241	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	IMTSP13
241	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	IMTSP17
241	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP05
241	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP06
241	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	IMTSP29
241	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP27
241	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	IMTSP08
241	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP09
241	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP14
241	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP20
241	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP16
241	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP34
241	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP11
241	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP12
241	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP04
241	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP18
241	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP19
241	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP22
241	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP21
241	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	IMTSP30
241	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	C	.	T	A2

ANEXO D - Representação do alinhamento das seqüências de nucleotídeos de 8 amostras pertencentes ao grupo B Foram incluídas no alinhamento o protótipo Ch18537. A seqüência representada acima da linha superior representa a seqüência consenso entre as demais.

[illegible][illegible][illegible]

ANEXO E – Topologia da árvore do grupo A do VSRH. As amostras clínicas e seqüências adquiridas do *GeneBank* dos genótipos do grupo A do VSRH estão incluídas.

ANEXO F - Topologia da árvore do grupo Bdo VSRH. As amostras clínicas e seqüências adquiridas do *GeneBank* dos genótipos do grupo B do VSRH estão incluídas.

REFERÊNCIAS

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akerlind B, Norrby E, Orvell C, Mufson MA. Respiratory syncytial virus: heterogeneity of subgroup B strains. **J Gen Virol.** 1988; 69 (9):2145-54.

Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, McIntosh K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **J Infect Dis.** 1985; 151(4): 626-33.

Anderson LJ; Paker RA; Strikas RL. Association between respiratory syncytial virus outbreaks and lower respiratory tract deaths of infants and young children. **J Infect Dis.** 1990; 161: 640-46.

Anderson LJ, Hendry RM, Pierik LT, Tsou C, McIntosh K. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. **J Infect Dis.** 1991 163: 687-92.

Arens MQ, Swierkosz EM, Schmidt RR, Armstrong T, Rivetna KA. Enhanced isolation of respiratory syncytial virus in cell culture. **J Clin Microbiol.** 1986; 23 (4): 800-2.

Atkins JT, Karimi P, Morris BH, McDavid G, Shim S. Prophylaxis for respiratory syncytial virus with respiratory syncytial virus-immunoglobulin intravenous among preterm infants of thirty-two weeks gestation and less: reduction in incidence, severity of illness and cost. **Pediatr Infect Dis J.** 2000; 19(2):138-43.

Atreya PL, Peebles 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.

Avila M, Salomon H, Carballal G, Ebekian B, Woryskovsky N, Crqueiro MC, Weissenbacher M. Isolation and identification of viral agents in argentinian children with acute lower respiratory tract infection. **Rev Infect Dis.** 1990; 12:974-81.

Barenfager JC, Leon N, Mueller T, Troutt. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. **J Clin Microbiol.** 2000; 38: 2824-28.

Boivin G, Cote S, Déry 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, Löseke 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: 944-51.

Botosso VF. Diversidade genética da glicoproteína g do vírus respiratório sincial humano (HRSV) entre amostras isoladas na cidade de São Paulo, 1995-1998 (tese). São Paulo: **Instituto de ciências biomédicas, Universidade de São Paulo**; 2002.

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

Brant CD. Respiratory syncytial virus. In: Lennete EH& Schmidt NJ. **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections.** American Public Health association 5th ed. Washington, 1979; 23: 695-706.

Bromberg K, Tannis G, Daidone B, Clarke L, Sierra M. Comparison of HEp-2 cell culture and abbot respiratory syncytial virus enzyme immunoassay. **J Clin Microbiol.** 1987; 25(2):434-6.

Bromberg K, Tannis G, Daidone B. Early use of indirect immunofluorescence for the detection of respiratory syncytial virus in HEp-2 cell culture. **Clin. Microbiol.** 1991; 96 (1): 127-9.

Brouard J, Freymuth F, Constantini S, Petitjean J, de Schrevel G, Duhamel JF. Prevalence and clinical aspects of A and B subgroups of respiratory syncytial virus

infection. Observation of 8 consecutive epidemics between 1982 and 1990]. **Arch Fr Pediatr.** 1993; 50(8):639-43.

Buckingham SC, Bush AJ, de Vincenzo JP. Nasal quantity of respiratory syncytial virus correlates with disease severity in hospitalized infants. **Pediatr Infect Dis J.** 2000; 19(2): 113-17.

Camara AA, Silva JM, Ferriani VP, Tobias KR, Macedo IS, Padovani MA, Harsi CM, Cardoso MR, Chapman MD, Arruda E, Platts-Mills TA, Arruda LK Risk factors for wheezing in a subtropical environment: role of respiratory viruses and allergen sensitization. **J. Allergy Clin Immunol.** 2004; 113 (3): 551-7.

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.

Candeias JAN, Himelfarb L. Pesquisa de anticorpos fixadores de complemento para vírus respiratório sincicial em habitantes da cidade de São Paulo. **Arq Fac Hig S Paulo.** 1967; 20 (2): 207-13.

Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial virus. **J Gen Virol,** 1991; 72: 2091-96.

Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. **J Clin Microb.** 1994; 32: 1-4.

Cane PA, Pringle CR. Evolution of subgroup a respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of aminoacid changes in the attachment protein. **J Virol** 1995; 69: 2918-25.

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: 155-60.

Cane PA. Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial virus. **Rev Med Virol.** 2001; 11: 103-16.

Carbonell-Estrany X, Quero J, Bustos G, Coteró A, Doménech E, Figueras-Aloy J, Fraga JM, García LG, García-Alix A, Río MGD, Krauel X, Sastre JBL, Narbona E, Roques V, Hernández SS, Zapatero M, For The iris study group rehospitalization because of respiratory syncytial virus infection in premature infants younger than 33 weeks of gestation: a prospective study. **Pediatr Infect Dis J.** 2000; 19: 592-7.

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

Chanock RM, Finberg L. Recovery from Infants with respiratory illness of virus related to Chimpanzee Coryza Agent (CCA). Epidemiological aspects of infection in infants and young children. **Am J Hyg.** 1957b; 66:291-300.

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

Cintra OAL, Owa MA, Machado AA, Cervi MC, Figueiredo LTM, 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: 408-12.

Coates HV, Kendrick L, Chanock RM. Antigenic differences between two strains of respiratory syncytial virus of respiratory syncytial virus. **Proc Soc Exp Biol Med.** 1963; 112: 958-64.

Coates HV, Alling DW, Chanock RM. An Antigenic Analysis of Respiratory Syncytial by Plaque Reduction Neutralization Test. **Am J Epidemiol.** 1966; 83: 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 PL; McIntosh K; Chanock RM. Respiratory Syncytial Virus. In: **BN Fields, Virology**. Lippincott-Raven Publishers. 4^o ed. Philadelphia, 2001. (cd room)

Cox MJ; Azevedo RS; Cane PA; Massad E; Medley GF. Seroepidemiological study of respiratory syncytial virus in São Paulo State, Brazil. **J. Med. Virol.** 1998; 55: 234-9.

Cubie HA, Inglis JM, McGowan AM. Detection of respiratory syncytial virus antigen and nucleic acid in clinical specimens using synthetic oligonucleotides. **J Virol Methods** 1991; 34: 27-35.

D'Elia C, Siqueira MM, Portes SA, Sant'Anna CC – Infecções do trato respiratório inferior pelo vírus sincicial respiratório em crianças hospitalizadas menores de um ano de idade. **Rev Soc Bras Med Trop.**, 2005, 38.

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: 41-9.

Diniz EMA, Vieira RA, Ishida MA, Feferbaum R, Krebs VLJ, Ceccon MEJ, Araújo MCK, Galvani ALS, Vaz FAC. Clinical and laboratorial evaluation of neonates with respiratory syncytial virus pneumonia. **4^o World congress of perinatal medicine** 1999; Buenos Aires, Argentina, 18-22 April.

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

Englund JA, Sullivan CJ, Jordan C, Dehner JP, Vercellotti GM, Balfour HH Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. **Ann. Intern. Med.** 1998; 109: 203-8.

Falsey AR, Walsh EE. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus subunit vaccine (PFP-2) in the institutionalized elderly. **Vaccine**. 1997; 15(10):1130-2.

Falsey AR. Respiratory syncytial virus infectious in older persons. **Vaccine**, 1998, 16: 1775-78.

Falsey AR, Walsh EE. Respiratory Syncytial virus infectious in adults. **Clin Microbiol. Rev.** 2000, 13: 371-84.

Falsey AR, Formica MA, Walsh EE. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. **J Clin Microbiol.** 2002; 40(3):817-20.

Frasibele S, Delfraro A, Facal L, Videla C, Galiano M, de Sierra MJ *et al.* Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina. 1993-2002. **J Med Virol.** 2003; 71: 305-12.

Freytmuth, F., Eugene, G., Vabret, A., Petitjean, J., Gennetay, E., Brouard, J., Duhamel, J.F., Guillois, B. Detection of respiratory syncytial virus by reverse transcription-PCR and hybridization with a DNA enzyme immunoassay. **J Clin Microbiol**, 1995; 33 (12): 3352-5.

Fulton RE & Middleton PJ. Comparison of immunofluorescence and isolation techniques in the diagnosis of respiratory syncytial of children. **Infect Immun.** 1974; 10(1): 92-101.

Garcia O, Martin M, Dopazo J, Arbiza J, Frabasile S, Russi J, Hortal M, Perez-Brena P, Martinez I, Garcia-Barreno B, Melero JA. 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: 5448-59.

Gimenez HB, Cash P, Melvin WT. Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparison of different virus isolates. **J Gen Virol.** 1984; 65: 963-71.

Gilbert LL, Dakama A, Bone BM, Thomas EE, Hegele RG. Diagnostic of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel. **J Clin Microbiol**. 1996; 34: 41-3.

Glenzen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. **J Pediatr**. 1981; 98: 708-15.

Gottschalk J, Zbinden R, Kaempf L, Heinzer I. Discrimination of respiratory syncytial virus subgroups A and B by reverse transcription-PCR. **J Clin Microbiol**. 1996; 34(1):41-3.

Groothuis JR, Gutierrez KM, Lauer BA. Respiratory syncytial virus infection in children with bronchopulmonary dysplasia. **Pediatr**. 1988; 82(2):199-203.

Hall CB, Douglas Jr. RG. Clinically useful method for the isolation of respiratory. **J Infect Dis**. 1975; 131 (1): 1-5.

Hall, C.B., Douglas, R.G., Jr., Geiman, J.M., Messner, M.K. Nosocomial respiratory syncytial virus infections. **N Engl J Med**. 1976; 293 (26): 1343-6.

Hall CB, Douglas RG, Geiman JM. Interferon production in children with respiratory syncytia virus, influenza, and parainfluenza infections. **J Pediatr**. 1978; 93: 28-32.

Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW *et al*. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. **J Infect Dis**. 1990; 162(6):1283-90.

Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. **J Infect Dis**. 1991; 163: 693-698.

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

Halstead DC, Todd S, Fritch G. Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus detection. **J Clin Microbiol.** 1990; 28 (5): 1021-5.

Han LL, Alexander JP, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus pneumonia among elderly: an assessment of disease burden. **J Infect Dis.** 1999, 179: 25-30.

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: 987-93.

Hein N. Aspectos epidemiológicos da infecção por vírus respiratórios em crianças internadas (dissertação). São Paulo: **Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo**, 2002.

Hendry RM, Talis AL, Godfrey E, Anderson Lj, Lennie BF, McIntosh K. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. **J Infect Dis.** 1986, 153: 291-7.

Hendry RM, Burnis Jc, Walsh EE, Wriggt PF, Hemming VG, Rodriguez WJ, Kim HW, Prince GA, McIntosh K. Strain-Specific serum antibody responses in infants undergoing primary infection with respiratory syncytial virus. **J. Infect. Dis.** 1988, 157: 640-7.

Hendry RM, Pierik LT, McIntosh K. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987. **J Infect Dis.** 1989; 160(2):185-90.

Hierholzer JC, Tannock GA, Hierholzer CM, Coombs RA, Kennett ML, Phillips PA et al. Subgrouping of respiratory syncytial virus strains from Australia and Papua New Guinea by biological and antigenic characteristics. **Arch Virol.** 1994; 136(1-2):133-47.

Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illness in the first of life. **Am J Epidemiol** 1991; 133: 1135-51.

Hornsleth A, Klug B, Nir M, Johansen J, Hansen KS, Christensen LS, Larsen LB. Severity of respiratory syncytial virus disease related to type and genotype of virus and to cytokine values in nasopharyngeal secretions. **Pediatr Infec Dis**. 1998; 17: 1114-21.

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.

Hughes JH. Physical and Chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and other agents. **Clin Microbiol Rev** 1993; 150-175.

Imaz MS, Sequeira MD, Videla C, Veronessi I, Cociglio R, Zerbini E et al. Clinical and epidemiologic characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fé, Argentina. **J Med Virol**. 2000; 61(1):76-80.

Iwane MK, Edwards KM, Szilagyi PG, Walker FJ, Griffin MR, Weinberg Ga, Coulen C, Poehling KA, Shone LP, Balter S, Hall CB, Erdman DD, Wooten K, Schwartz B. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. **Pediatr**. 2004; 113: 1758-64.

Johnson PJ, Olmsted RA, Prince GA, Murphy BR, Alling DW, Walsh EE, Collins PL. Antigenic relatedness between glycoprotein of human respiratory virus subgroup A and B: evaluation of the contribution of F and G glycoprotein to immunity. *J. Virol*. 1987, 61: 3163-6.

Karron RA, Singleton RJ, Bulkow L et al. Severe respiratory syncytial virus disease in Alaska Native children. **J Infec Dis**. 1999; 180: 41-9.

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: 451-8.

Kingsbury, DW. Paromyxoviridae and their replication. In: B.N. **Fields, Virology**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 2001, 942-945.

Law BJ, Carbonell-estrany X, Simões EAF. An update on respiratory syncytial virus epidemiology: a developed country perspective. **Resp Med**. 2002; 96: S1-S7.

MacDonald NE, Hall CB, Suffin SC, Alexson C, Harris PJ, Manning JÁ Respiratory syncytial viral infection in infants with congenital heart disease. **N Engl J Med**. 1982, 307 (7): 397-400.

Machado CM, Vilas Boas LS, Mendes AVA, Santos MFM, Rocha IF, Sturaro D, Dulle FL, Pannuti CS. Low mortality rates related to respiratory vírus infections after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**. 2003; 31: 695-700.

Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A. Survey and Summary realtime PCR in virology. **Nucleic Acids Res**. 2002, 30 (6): 1292-305.

Martinello RA & Chen MD. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. **J Infect Dis**. 2002; 186: 839-42.

McCarthy AJ, Kingman HM, Kelly C, Taylor GS, Caul EO, Grier D, Moppett J, Foot ABM, 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: 1315-22.

McIntosh K, Halonen P, Ruuskanen O. Report of a workshop on respiratory viral infections: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. **Clin Infect Dis**. 1993; 16:151-164.

Meteyard JD, Young PR Optimization of PCR and automated sequencing of clinical isolates of respiratory syncytial virus. **J Virol Methods**. 1994, 50:335-42.

Miyao CR, Gilio AE, Vieira S, Hein N, Pahl MMC, Betta SL, Durigon EL, Stewien KE, Queiroz DAO, Botosso VF, Gomes MCS, Lopes CLBC, Ejzenberg B, Okay Y. Infecções virais em crianças internadas por doença respiratória inferior. **J Pediatr**. 1999; 75: 334-44.

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

Moura FEA, Blane A, Frabasile S, Delfraro A, Sierra MJ, Tome L, Ramos EAG, Siqueira MM, Arbizza J. Genetic diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of northeastern Brazil. **J Med Virol.** 2004; 74:156-160.

Mufson MA, Akerlind-Stopner B, Orvell C, Belshe RB, Norrby E. A single-season epidemic with respiratory syncytial virus subgroup B2 during 10 epidemic years, 1978 to 1988. **J Clin Microbiol.** 1991; 29(1):162-5.

Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **J Gen Virol.** 1985; 66: 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; 74:161-65.

Nascimento, JP, Siqueira, MM, Suttmoller F, Krawczuk MM, Farias V, Ferreira V, Rodrigues MJ Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Rev Inst Med trop S Paulo.** 1991, 33 (4): 287-96.

Navarro-Marí, J.M., Sanbonmatsu-Gámez, S., Pére-Ruiz, M., Rosa-Fraile, M.L. Rapid detection of respiratory viruses by shell vial assay using simultaneous culture of Hep-2, LLC-MK2, and MDCK cells in a single vial. **J Clin Microbiol.** 1999, 37 (7): 2346-7.

Norby E, Mufson MA, Alexander H, Houghten RA, Lerner RA. Site-directed serology with synthetic peptides representing the large glycoprotein G of respiratory syncytial virus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1987; 84(18):6572-6.

Nyati MK, Sreekumar A, Li S, Zhang M, Rynkiewicz SD, Chinnaiyan AM et al. High and selective expression of yeast cytosine deaminase under a carcinoembryonic antigen promoter-enhancer. **Cancer Res** 2002; 62(8): 2337-42.

Ogra PI. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. **Pediat Resp Rev.** 2004, 5: S119-26.

Ong GM, Wyatt DE, O' Neill HJ, McCaughey C and Coyle PV. A comparison of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for the diagnosis of respiratory infections in children with bronchiolitis and the implications for a cohorting strategy. **J Hosp Infect.** 2001; 49: 122-128.

Parrot RH, Kim HW, Arrobio Jo, Hodes DS, Murphy BR, Brand CD, Camargo E, Channock RM. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. II. Infection and diseases with respect to age, immunologic status, race and sex. **Am J epidemiol.** 1973, 98: 289-300.

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

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

Pitkaranta A, Jero J, Arruda E, Virolainen A, Hayden FG. Polymerase chain reaction-based detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus in otitis media with effusion. **J Pediatr.** 1998; 133 (3): 390-4.

Polak MJ. Respiratory syncytial virus: Overview, treatment and prevention strategies. 2004; 14 (1): 15-23.

Pohl C, Green M, Wald ER, Ledesma-Medina J. Respiratory syncytial virus infections in pediatric liver transplant recipients. **J Infect Dis** 1992; 165(1):166-9.

Prober CG, Sullender WM. Advances in prevention of respiratory syncytial virus infections. **J Pediatr** 1999; 135(5): 546-58.

Queiroz DA, Durigon, EL, Botosso VF, Ejzenberg B, Vieira SE, Mineo JR, Yamashita, C, Hein N, Lopes CL, Cacharo AL Stewien KE – Immune response to respiratory syncytial virus in Young Brazilian children. **Braz J Med Biol Res.** 2002, 35(10): 1183-93.

Rakes GP, Arruda E, Ingram JM, Hoover GE, Zambrano JC, Hayden FG, Platts-Mills TAE, Heymann PW. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and Eosinophil Analyses. **Am J Respir Crit Care Med.** 1999, 159: 785-90.

Reese PE, Marchette NJ. Respiratory syncytial virus infection and prevalence of subgroups A and B in Hawaii. **J Clin Microbiol.** 1991; 29(11): 2614-5.

Robertson SE, Roca A, Alonso P, Simoes EA, Kartasasmita CB, Olaleye DO, Odaibo GN, Collinson M, Venter M, Zhu Y, Wright PF Respiratory syncytial virus infection: denominator-based studies in Indonesia, Mozambique, Nigeria and South Africa. **Bull World Health Organ.** 2004, 82 (12): 914-22.

Rovida F, Percivalle E, Zavattoni M, Torsellini M, Sarasini A, Campanini G, Paolucci S, Baldanti F, Revello MG, Gerna G. Monoclonal antibodies versus reverse transcription-PCR for detection of respiratory tract infections admitted to hospital. **J Med Virol.** 2005; 75:336-47.

Russi JC, Chiparelli H, Montano A, Etorena P, Hortal M. Respiratory syncytial virus subgroups and pneumonia in children. **Lancet** 1989; 2(8670):1039-1040.

Saijo M, Takahashi S, Kokubo M et al. The role of respiratory syncytial virus in acute bronchioliteis in small children in northern Japan. **Acta Pediatr Jpn** 1994, 36: 371-4.

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: 344-54.

Seki K, Tsutsumi H, Ohsaki M, Kamasaki H, Chiba s. Genetic variability of respiratory syncytial virus subgroup A strain in 15 successive epidemics in one city. **J Med Virol**. 2001; 64: 374-80.

Schmidt AC, Couch RB, Galasso GJ, Hayden FG, Mills J, Murphy BR, Chanock RM. Current research on respiratory viral infections: Third International Symposium. **Antiviral Res**. 2001; 50: 157-196.

Shay D, Holman RC, Roosevelt GE, Clark MJ, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus – associated deaths among US children, 1979-1997. **J Infect Dis**. 2001. 183: 16-22.

Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B, Bjorksten B. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. **Pediatr** 1995; 95(4):500-505.

Silvestri M, Sabatini F, Defilippi A, Rossi G. The wheezy infant – immunological and molecular considerations. **Pediatr Resp Rev**. 2004; S81-S87.

Siqueira MM, Nascimento JP, Anderson LJ. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus group A and B isolates in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol**, 1991, 29: 557-59.

Souza LSF, Ramos EA, Carvalho FM, Guedes VM, Souza LS, Roch CM, Soares AB, Velloso LD Lde F, Macedo IS, Moura FE, Siqueira M, Fortes S, Jesus CC, Santiago CM, Carvalho AM, Arruda E. Viral respiratory infections in Young children attending day care in urban northeast Brazil. **Pediatr Pulmonol**. 2003, 35(3): 184-191.

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

Straliotto SM, Roitman B, Lima JB, Fischer GB, Siqueira MM – Respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis: comparative study of RSV groups A and B infected children. **Rev Soc Bras Med Trop**. 1994, 27(1): 1-4.

Stralioto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha MLT, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2002, 35 (4): 283-291.

Struck A, Forster J, Ihorst gG, Werchau H, König W, König B. Respiratory syncytial virus: G gene genotype and disease severity. **Pediatrc Infect Dis J.** 2004 Nov; 23(11):1000-2.

Stumöller F, Ferro ZP, Asensi MD, Ferreira V, Mazzei IS, Cunha BL. Etiology of acute respiratory tract infections among children in a combined community and hospital study in Rio de Janeiro. **Clin Infect Dis** . 1995; 20:854-860.

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

Sullender WM, Sun L, Anderson LJ. Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. **J Clin Microbiol**, 1993; 31(5):1224-1231.

Sullender WM, Britt WJ – Antigenic and immunogeneic analysis of group A and group B respiratory syncytial virus G proteins expressed from recombinant baculoviruses. **J Gen Virol**, 1996, 77: 641-648.

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: 925-32.

Trento A, Galiano M, Videla c, Carballal G, Garcia-Barreno B, Melero JA, Palomo C. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. **J Gen Virol.** 2003; 84: 3115-20.

Tristram DA, Welliver RC. Respiratory syncytial virus. In Diagnostic Procedure for viral, rickettsial and chlamydial infectious. 7^{ed}. American Public Health Association, 1996.

Tsutsumi H, Onuma M, Suga K, Honjo T, Chiba Y, Chiba S et al. Occurrence of respiratory syncytial virus subgroup A and B strains in Japan, 1980 to 1987. **J Clin Microbiol.** 1988; 26(6):1171-74.

Vallada MG. Infecção por vírus respiratórios em crianças internadas em enfermaria pública (dissertação). São Paulo: **Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo**, 1996.

Valdivia A, Savon C, Sarmiento L, Morier L, Otero A, Soto Y, Oropesa S, Goyenechea A Analysis of respiratory syncytial virus in clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction restriction mapping. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1997; 92 (3): 389-93.

Valdivia A, Gonzalez G, Chacon D, Savon C, Otero A, Valdes O et al. Antigenic and genetic characterization of twenty-six strains of human respiratory syncytial virus (subgroup A) isolated during three consecutive outbreaks in Havana city, Cuba. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1999; 94 (4):469-475.

Van den Hoogen BG, Jong JC, Groen J, Kuiken T, Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nat Med.** 2001, 7: 719-724.

Van Dyke RB, Murphy-Corb M. Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by DNA-RNA hybridization. **J Clin Microbiol.** 1989; 27(8): 1739-43.

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; 34(2):177-183.

Van Elden, L.J.R., van Loon, A.M., van der Beek, A., Hendriksen, A.W., Hoepelman, A.I.M., van Kraaij, M.G.J., 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): 4378-4381.

Van Regenmortel, MHV; Fauquet, CM; Bishop, DHL; Cartens, EB; Estes, MK; Lemon, SM; Maniloff, J; Mayo, MA; Mcgeoch, DJ; Pringle, CR & Wickner, RB. Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. **7th report of the International Committee on Taxonomy of viruses**. Academic Press, San Diego, 2000; 525 – 59.

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: 2117-24.

Viegas M & Mistchenko AS. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup A over a six-year period (1999-2004). **J Med Virol**. 2005; 77: 302-310.

Vieira, SE, Stewien KE, Queiroz AO, Durning EL, Torok TJ, Anderson LJ, Myao CR, Heing N, Botosso VF, Pahl MM, Gilio AE, Ejzenberg B, Okay Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med trop S Paulo**. 2001, 43 (3): 125-131.

Waris M. Pattern of respiratory syncytial virus epidemics in Finland: two-year cycles with alternating prevalence of groups A and B. **J. Infect. Dis.**, 1991, 163: 464-469.

Weber MW, Dackour R, Usen S, Schneider G, Adegbola RA, Cane P *et al*. The clinical spectrum of respiratory syncytial virus disease in The Gambia. **Pediatr Infect Dis J** 1998; 17(3):224-230.

Weinberg GA, Erdman D, Edwards K, *et al*. Superiority of reverse transcription-PCR to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory infections in children. **J Infect Dis**. 2004; 189: 706-10.

Welliver RC. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses. **Pediatr Infect Dis J**. 2003, 22 (2): S6- S12.

Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levin S. Nucleotide sequence of the g protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1985; 82: 4075-79.

Wertz GW, Moudy R. Antigenic and genetic variation in human respiratory syncytial virus. **Pediatr Infect Dis J**. 2004; 23(1): S19-S24.

Whiley DM, Syrnis MW, Mackay IM, Sloots TP. Detection of human respiratory syncytial virus in respiratory samples by lightcycler reverse transcriptase PCR. **J Clin Microbiol**. 2000; 40 (12): 4418-22.

Whimbey E, Couch RB, Englund JA, Andreeff M, Goodrich JM, Raad II, Lewis V, Mirza N, Luna MA. Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adults patients with leukemia. **Clin Infect Dis**. 1995; 21: 376-379.

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: 778-782.

Wilson SD; Robert K; Hammond K; Ayres JG; Cane, PC. Estimation of incidence of respiratory syncytial virus infection in schoolchildren using salivary antibodies. **J. Med. Virol.**, 2000, 61: 81-4.

Wulff H, Kidd P, Wennwe HA. Respiratory syncytial virus: Observations on antigenic heterogeneity. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1964; 115: 240-3.

Zlateva KT, Lemey P, Vandamme AM, van Ranst M. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup A: positively selected sites in the attachment G glycoprotein. **J Virol** 2004; 78: 4675-83.

Zelaya EA, Petterson CA, Forsgren M, Orvell C, Strannegard O. Respiratory syncytial virus infection in hospitalized patients and healthy children in El Salvador. **Am J Trop Med Hyg**. 1994; 51: 577-84.

Zheng H, Peret TC, Randolph VB, Crowley JC, Anderson LJ. Strain-specific reverse

transcriptase PCR assay: means to distinguish candidate vaccine from wild-type strains of respiratory syncytial virus. **J Clin Microbiol.** 1996; 34: 334-7.