JOSÉ DE PAULA PAZ JÚNIOR

**Aplicação de ensaio imunoenzimático para detecção de
anticorpos contra o vírus respiratório sincicial em receptores
de transplante de células tronco-hematopoéticas**

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

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Dra. Clarisse Martins Machado

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Paz Júnior, José de Paula

Aplicação de ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos contra o vírus respiratório sincicial em receptores de transplante de células tronco-hematopoéticas / José de Paula Paz Júnior. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Clarisse Martins Machado.

Descritores: 1.Vírus sincicial respiratório humano 2.Transplante de células tronco-hematopoéticas 3.Infecções respiratórias 4.Técnicas imunoenzimáticas 5.ELISA 6.Imunoglobulina G

USP/FM/SBD-150/08

A Deus

por

todas as bênçãos concedidas.

Aos meus pais

O ferroviário José e a costureira e dona de casa Maura (in memoriam)

Por tornar seus exemplos de vida em meu maior ensinamento.

A saudade é grande

Os meus queridos irmãos Cássia Regina, Maura Rosa, Julio e Luciene,

Pelo amor, carinho, afeto

Pelo apoio, incentivo e dedicação

Por estarem presentes em todos os momentos

Amo vocês

Agradecimentos

À Dra. Clarisse Martins Machado, minha orientadora, grande professora, pesquisadora dedicada, uma mulher corajosa que admiro e sou eternamente grato pela oportunidade, confiança e acima de tudo por compartilhar o seu saber.

À Dra. Vanda Ueda, pesquisadora fantástica, profissional exemplar cujos conhecimentos e ensinamentos foram o alicerce deste trabalho, obrigado por tudo professora.

Ao Profº Dr. Cláudio Sérgio Pannuti, pela oportunidade que me concedeu, por manter as portas abertas sem distinção, conquistou minha admiração e meu respeito, grande professor e um grande exemplo.

À Lucy Vilas Boas, profissional dedicada e exemplar, amiga para todos os momentos, principalmente os mais difíceis, humana e íntegra.

À profª Dra. Maria Aperecida Basile por seu exemplo de dedicação ao ensino.

À profª. Sandra do Lago Moraes ao ceder o laboratório de malária para a dosagem de proteínas do antígeno do vírus sincicial, pelas análises e resultados da dosagem de proteínas e pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

Aos Doutores Antonio Valter Ferreira e Viviane F. Botosso pelas valiosas sugestões e contribuições feitas no exame de qualificação.

Ao laboratório de Malária, em especial à Fabiana Maria de Souza Leoratti e Melissa da Silva Bastos, pelo auxílio, gentileza e tempo doados na dosagem de proteínas.

À Alexandra Dias Reis e Adriana Freire Machado, por compartilhar generosamente seus conhecimentos e brilhantismo, grandes pesquisadoras, amigas leais e cujo futuro é brilhante.

À Daniela S. de Angelis e Renato dos Reis Oliveira pela amizade, trabalho e convívio, por dividir todos os momentos e pelo apoio nas horas difíceis.

À Alessandra Aparecida Machado, Jaila Borges, Silvia Helena, Kátia Neves e Rodrigo Resende, por compartilhar a sua fé, por me incluir em suas orações e por compartilhar

generosamente sua vivência com Deus, me ensinando à amenizar as dificuldades impostas à vida, pela força da prece.

Às meninas Maria Cristina, Cynthia Liliane e Laura Sumita, pela alegria, carinho, apoio e atenção durante todos estes anos.

A todos os amigos do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP, por estarmos juntos compartilhando momentos de amizade e carinho durante todos estes anos: Dr. Aluísio, Dr. José Eduardo Levi, Dr. Luiz Vicente, Amanda, Adriana Fumie Tateno, Ana Carolina, Anderson Molina, Carla, Célia, Cícero, Cristina, Daniel, Débora, Diana, Eduardo, Elaine, Érica, Eveline, Jennifer, José Eduardo, Jussara, Kátia, Luciano, Marcelo, Maria, Maria Carolina, Marli, Michela, Nadily, Shinai, Sílvia, Synara, Sônia, Rodrigo Merlim, Rodrigo Vela, Tânia Regina, Vera, Viviane, Wilton.

À biblioteca do IMT em especial a Adenilson Leite, Vera Lucia, Sonia Pedroso e Maria Ângela de Castro por todo auxílio, simpatia e amizade.

Às Secretárias da pós-graduação da IM em especial Roseli Antonia, Rosemeire Aparecida Ribeiro e Vânia Regina por todo carinho e atenção.

Aos funcionários do Instituto em especial a Almir Robson, Maria Iranides, Ana M. de Paula, Jandira Takeda, Jonisi Santo, Maristela Gonçalves e Vera Lucia Valbuena, por todo apoio e amizade.

Às amigas Alessandra Marque e Vera Lucia Marque, pela maravilhosa convivência e grande e sincera amizade.

Aos amigos do laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, Dra. Fatia, Dra. Hana, Wilson Fernandes, Sávio Stefanini, Kathleen, Marisa, Eliana, Silvia, Thélia, Alexandre Zanotti, Luciana Hamer, Luciana.

Aos pacientes, cujas amostras foram empregadas neste estudo, agradeço por toda generosidade. Mesmo diante de dificuldades extremas, foram generosos e suas doações possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado.

À CAPES e ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

1. Sumário

1.1. Histórico	02
1.2. Classificação Viral	03
1.3. Estrutura Viral	04
1.4. Variabilidade Antigênica e Genética Viral	08
1.5. Epidemiologia	09
1.6. Manifestações clínicas	11
1.7. Diagnóstico Laboratorial das Infecções pelo RSV	12
1.8. Resposta Imune	18
1.9. Justificativa do Estudo	21
2. Objetivos	23
3. Metodologia	25
3.1. Desenvolvimento do ELISA anti-RSV e teste de avides	26
3.2. Comparação entre o ELISA IMTSP e o ELISA comercial.....	30
3.3. População estudada	31
3.4. Resposta à infecção pelo RSV pela ascensão de anticorpos específicos ...	34
3.5. Avaliação da dinâmica dos anticorpos anti-RSV pós transplante.....	34
3.6. Aspectos Éticos.....	34
3.7. Análise Estatística.....	36
4. Resultados	37
4.1. Preparo do ELISA	37
4.2. Avides de anticorpos	38
4.3. Comparação do ELISA IMTSP com ensaio comercial	38

4.4. Infecção pelo RSV na população estudada	39
4.5. Resposta à infecção pelo RSV pela ascensão de anticorpos específicos....	40
4.6. Dinâmica dos anticorpos anti-RSV pós-transplante	42
5 . Discussão	44
6. Conclusão	52
7. Referencias Bibliográficas	54
8. Anexo.	

Listas de Tabelas.

Tabela 1. Classificação do índice Kappa	30
Tabela 2. Critérios para inclusão de casos e controles	32
Tabela 3. Características dos pacientes infectados e não-infectados pelo RSV.....	33
Tabela 4. Reta de regressão para definição do soro padrão em UA	37
Tabela 5. Reta de regressão para cálculo das amostras em UA	38
Tabela 6. Comparação entre o ELISA IMTSP e o ELISA comercial	39
Tabela 7. Distribuição das infecções pelo RSV segundo a estação do ano	40

Listas de Figuras

Figura 1. Taxonomia do Vírus Sincicial Respiratório Humano.....	04
Figura 2. Estrutura Genômica do Vírus Sincicial Respiratório Humano	07
Figura 3 . Proteínas do Vírus Sincicial Respiratório Humano na Partícula viral	08
Figura 4. Anticorpos anti-RSV em receptores de TCTH antes e após o diagnóstico de infecção respiratória pelo RSV	41
Figura 5. Dinâmica de anticorpos anti-RSV em receptores de TCTH	43

Listas de Abreviaturas

AAG – ANEMIA APLÀSTICA GRAVE

CUTOFF – LIMAR DE POSITIVIDADE

DECH- DOENÇA DO ENERTO CONTRA O HOSPEDEIRO

DO – DENSIDADE ÓPTICA

ELISA – ENSAIO IMUNO ENZIMÁTICO

HLA – HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN (ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO)

IFN – INTERFERON

IG- IMUNOGLOBULINAS

IgA- IMUNOGLOBULINA A

IgG- IMUNOGLOBULINA G

IgM- IMUNOGLOBULINA M

IL- INTERLEUCINAS

LH – LINFOMA DE HODGKIN

LLA- LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA

LLC – LEUCEMIA MIELIÓDE CRÔNICA

LMA– LEUCEMIA MIELIÓDE AGUDA

LNH – LINFOMA NÃO HODGKIN

MHC – MAJOR HISTOCOMPABILITY COMPLEX (COMPLEXO MAIOR DE HISTOCOMPATIBILIDADE)

MIP- 1 α – MACROPHAGES INFLAMATORY PROTEIN - 1 α (PROTEÍNA INFLAMATÓRIA DOS MACRÓFAGOS)

MM – MIELOMA MÚLTIPLO

NK – NATURAL KILLER

OPD – O-FENILENODIAMINA

ORF – OPEN READING FRAME (SEQUENCIAS ABERTAS DE LEITURA)

PBMC – PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS (CELULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO)

TCR – t CELL RECEPTOR (RECEPTOR DE CÉLULAS T)

TCTH – TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS

TMO – TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

TNF –TUMORAL NECROSIS FACTOR (FATOR DEDE NECROSE TUMORAL)

RESUMO

Paz Jr JP. Aplicação de ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos contra o vírus respiratório sincicial em receptores de transplante de células tronco-hematopoéticas (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

RESUMO:

O vírus respiratório sincicial (RSV) é responsável por importante morbidade em receptores de transplante de células tronco-hematopoéticas (TCTH), especialmente no período que antecede a enxertia. A imunidade induzida pela infecção pelo RSV é transitória e as reinfecções são freqüentes. O comportamento e papel dos anticorpos anti-RSV em receptores de TCTH é desconhecido. Em amostras de soro estocadas, ensaio imunoenzimático (ELISA) foi aplicado para detecção de anticorpos anti-RSV para avaliar a dinâmica desses anticorpos antes e após o TCTH, em pacientes com e sem infecção pelo RSV, bem como a resposta de anticorpos específicos nos pacientes com infecção pelo RSV diagnosticada por imunofluorescência direta. A mediana do tempo de coleta das amostras pré-TCTH foi de -35 e -44 dias nos casos e controles, respectivamente, com média de títulos de anticorpos anti-RSV de 2490 UA/mL e 2872 UA/mL, respectivamente. Após o transplante, as medianas de tempo das 3 amostras analisadas dos pacientes com infecção pelo RSV foram d+14, d+52 e d+89 e os respectivos títulos de anticorpos foram 2457 UA/mL, 2715 UA/mL e 2950 UA/mL. Nos pacientes sem infecção pelo RSV (controles), as medianas de tempo das 3 amostras analisadas foram d+9, d+69 e d+93 e os respectivos títulos de anticorpos foram 2738 UA/mL, 2794 UA/mL e 2642 UA/mL. Não houve diferença estatística entre os dois grupos. Nenhum dos pacientes com infecção pelo RSV apresentou elevação de quatro vezes nos títulos de anticorpos.

Descritores: 1. Vírus Respiratório Sincicial 2. Transplante de Células Tronco-Hematopoéticas 3. Infecções Respiratórias 4. Técnicas Imunoenzimáticas 5. ELISA 6. IgG

SUMMARY

Paz Jr JP. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of Respiratory Syncytial Virus antibodies in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. (dissertation). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

SUMMARY:

Respiratory syncytial virus (RSV) infection can cause significant morbidity and mortality in haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients, especially when upper respiratory tract infection (RTI) progresses to lower RTI, which is expected to occur in more than 50% of the patients. The humoral immunity induced by RSV infection is transient and reinfections are frequent. The dynamics and role of anti-RSV antibodies in HSCT recipients are unknown. In stored serum samples, an enzyme-linked immunosorbent assay (EIA) was applied to evaluate the dynamics of anti-RSV antibodies in HSCT recipients with and without RSV infection, as well as the specific humoral response in HSCT recipients with RSV infection diagnosed by direct immunofluorescent assay in nasal wash samples. Pre-transplant samples were selected at a median time of 35 and 44 days and the mean concentration of RSV antibodies were 2490 AU/mL and 2872 AU/mL, in cases and controls, respectively. After HSCT, serum samples from patients with RSV infection (cases) were evaluated at median time of 14, 52 and 89 days, and the respective mean concentrations of anti-RSV antibodies were 2457 AU/mL, 2715 AU/mL and 2950 AU/mL. In patients without RSV (controls), serum samples were evaluated at median time of 9, 69 and 93 days, and the respective mean concentrations of anti-RSV antibodies were 2738 AU/mL, 2794 AU/mL e 2642 AU/mL. Difference was not statistically significant. No patient developed a four-fold rise in RSV antibody titers.

Descriptors: 1. Respiratory Syncytial Virus 2. Haematopoietic Stem Cell Transplantation 3. Respiratory Tract Infections 4. Immunoenzyme Assays 5. Enzyme Immunosorbent Assay 6. IgG

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Histórico

Em outubro de 1955, Morris e colaboradores isolaram um novo agente viral a partir de secreção colhida da garganta de um chimpanzé, durante epizootia ocorrida no laboratório do Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), em Washington DC. (Morris *et al.*, 1956). O vírus foi inicialmente denominado de agente de coriza de chimpanzé (*Chimpanzee Coryza Agent - CCA*), uma vez que a doença respiratória, que acometeu inicialmente uma colônia de 20 animais, se transmitiu a todos os animais do instituto. Parte dos animais foram afetados pela doença e os demais desenvolveram anticorpos para o vírus durante o período de convalescença. A doença caracterizava-se pela ocorrência de sintomas como secreção nasal mucopurulenta, tosse e espirros. Tratadores que entraram em contato com animais infectados foram contaminados e desenvolveram sintomas de infecção de vias aéreas superiores, com quadros de menor gravidade. Entretanto não foi possível isolar o agente viral nas amostras destes funcionários (Morris *et al.*, 1956).

O primeiro isolamento em humanos ocorreu em 1956. Channock e Finberg isolaram um agente desconhecido em crianças com pneumonia e laringotraqueobronquite e posteriormente suspeitaram tratar-se do mesmo agente causador da doença em chimpanzés. Pela capacidade de promover sincícios em cultura de células e pela afinidade pelo trato respiratório, o nome CCA foi substituído por Vírus Respiratório Sincicial (RSV) (Channock *et al.*, 1957a). Inquérito soro epidemiológico realizado em Washington no mesmo ano demonstrou que 90% das crianças da capital apresentavam anticorpos e, portanto, já haviam entrado em contato com o RSV (Channock *et al.*, 1957b).

Após o isolamento de Baltimore, outros estudos realizados em diversos locais do mundo relataram dados similares, associando o RSV a doenças do trato respiratório durante a infância, tais como os estudos realizados em Illinois (1958-1959), Nova York (1959), Pensilvânia (1959-1960), Califórnia (1961), Inglaterra (1961) e Austrália (1961) (Beem *et al.*, 1961).

No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez por Candeias, em agosto de 1964, a partir de secreção respiratória de quatro crianças internadas no Hospital Infantil Menino Jesus. Os isolados eram provenientes de uma criança de 3 meses de idade com broncopneumonia e desnutrição, de duas crianças com broncopneumonia e bronquiolite, com 3 dias e 3 meses de idade, respectivamente, e de uma criança com 45 dias de vida com quadro de broncopneumonia. A confirmação do isolamento do RSV foi feita utilizando-se o teste de neutralização com soro padrão (Candeias *et al.*, 1967).

1.2. Classificação Viral

O vírus é classificado como membro da ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, e gênero *Pneumovirus* (Falsey & Walsh 2000; van Regenmortel *et al.*, 2001). A família *Paramyxoviridae* inclui dois outros gêneros, os *paramyxovírus* e *morbilivirus*. A subfamília *Pneumovirinae* tem dois gêneros: O gênero *Pneumovírus* inclui o RSV humano, o RSV bovino, o RSV caprino e o de camundongos (PVM). O segundo gênero, *Metapneumovirus* inclui o vírus da pneumonia de aves (APV) e o Metapneumovirus humano (hMPV) (Collins *et al.*, 2001).

A figura 1 mostra a classificação da família *Paramyxoviridae*.

Figura 1 - Taxonomia do Vírus Sincicial Respiratório Human

(National Library of Biotechnology Information, 2006; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2002).

1.3. Estrutura Viral

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

apresentam formas esféricas ou pleomórficas medindo de 150 a 300 nm de diâmetro (Collins *et al.*, 2001).

O genoma do RSV é RNA de fita simples, de polaridade negativa, não segmentado, composto de aproximadamente 15.222 nucleotídeos e 10 genes que codificam 11 proteínas: NS1, NS2 (não estruturais), nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M), pequena proteína hidrofóbica (SH), proteína de adsorção (G), proteína de fusão (F), proteínas da matriz (M2-1, M2-2) e complexo polimerase (L) (Hall, 2001; Hacking *et al.*, 2002).

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

A função das proteínas NS1 e NS2 não é completamente conhecida. Entretanto, o fato de serem não estruturais sugere que estejam relacionadas com a regulação da transcrição e da replicação do ácido nucléico viral (Collins *et al.*, 2001).

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

As proteínas M2 são restritas ao gênero *Pneumovirus*. Diferentemente de outros genes do RSV, cada unidade transcricional do gene M2 codifica duas proteínas a M2-1 e a M2-2, que são internas e não-glicosiladas (Collins *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 2005). A proteína M2-1 atua como um importante fator para transcrição na polimerase, principalmente para genes longos. Sua ação é como um fator de alongação permitindo a completa síntese dos mRNAs (Collins *et al.*, 1996; Mason *et al.*, 2003). A proteína M2-2 atua com função regulatória e está envolvida

na mudança da transcrição para a replicação do RNA viral durante o ciclo replicativo do vírus. Acredita-se que o fato de sua *open reading frame* ser sobreposta à do M2-1 ocorre um fino ajuste na expressão da M2-2 durante a replicação do RSV (Cheng *et al.*, 2005).

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

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

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

As proteínas F e G são antigenicamente importantes porque estimulam a produção de resposta imune protetora (Van Bleek *et al.*, 2003; Sullender *et al.*, 1991). A proteína F apresenta duas subunidades após a glicosilação: a F1 e F2. A subunidade F1, relativamente bem conservada, fica ancorada à membrana sendo responsável pela ligação do envelope viral à membrana da célula hospedeira e posterior liberação do nucleocapsídeo ao citoplasma celular. As espículas da proteína F apresentam-se de forma homotetramérica, ou seja, cada espícula é formada por quatro unidades idênticas da proteína e induz à formação de anticorpos neutralizantes (Sullender *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2001).

A proteína G possui de 289 a 299 aminoácidos, é uma glicoproteína tipo II que possui domínio hidrofóbico entre os resíduos 38 e 66 que serve como sinal de

ancoragem para região transmembrana. É responsável pela adesão do vírus à célula receptora durante os estágios iniciais da infecção. Anticorpos monoclonais (MAbs) diretamente contra a proteína G, neutralizam eficientemente sua infectividade *in vitro*. Alguns trabalhos apontam a proteína G como um importante imunógeno para o desenvolvimento de vacinas, mas a proteção efetiva contra o vírus é mediada pela reatividade cruzada com outra proteína de superfície, a proteína F (Rueda *et al.*, 1991). A proteína G apresenta grande variabilidade em relação a outras proteínas e não possui atividade de hemaglutinina e de neuraminidase como a do vírus influenza ou de outro paramixovírus (Sullender *et al.*, 1991).

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

Figura 2 - Estrutura Genômica do Vírus Sincial Respiratório Humano

Figura 3 – Proteínas do Vírus Sincial Respiratório Humano na Partícula viral

1.4. Variabilidade Antigênica e Genética Viral

Após sua descoberta em 1955, o RSV foi considerado como sorotipo único. A existência de variações antigênicas foi observada a partir dos anos 60.

Coates e Chanock observaram variabilidade presentes em amostras isoladas do RSV pelo teste de neutralização, utilizando soros de animais (coelhos ou cobaias) hiperimunes. Os estudos mostraram que soros de animais imunizados com a cepa Long não neutralizavam totalmente a cepa A1 evidenciando a existência de diferenças antigênicas entre duas amostras do vírus (Coates & Chanock, 1963). Diferenças antigênicas foram observadas quando comparadas as cepas Long (isolada em 1956) e a cepa CH-18537 (isolada em 1962) (Coates *et al.*, 1966).

Com o surgimento e a aplicação de anticorpos monoclonais (MAbs) nas pesquisas dos RSVs, as diferenças se tornaram mais evidentes. Anticorpos monoclonais de camundongos preparados contras as proteínas F, G, N, M e P do RSV, demonstraram a existência de similaridades entre as cepas Long e A2, sendo a cepa CH-18537 antigenicamente distinta das demais (Anderson *et al.*, 1985; Mufson *et al.*, 1985). Observou-se que a glicoproteína G apresentava maior divergência em relação a outras proteínas. Baseando-se em sua reatividade

cruzada foram então estabelecidos os dois grupos antigênicos do RSV: grupos A e B. O grupo A inclui as cepas Long e A2 do vírus; o grupo B as cepas isoladas na Virginia e a cepa CH-18537 do vírus (Anderson *et al.*, 1985; Mufson *et al.*, 1985; Garcia-bareno *et al.*, 1989).

As diferenças presentes nos grupos antigênicos são de fundamental importância para a compreensão da resposta imune frente a infecções e reinfecções (Sullender, 2000).

Alguns autores associam as cepas de RSV do grupo A com maior gravidade da doença, embora outros trabalhos apontem o grupo B como fator de maior virulência. Não se sabe ao certo a importância clínica da diferenciação dos grupos. Para exemplificar, infecções com o grupo A não protegem o hospedeiro de futuras infecções com o mesmo tipo, mas, podem diminuir a gravidade da doença (Sullender *et al.*, 1996; Garcia-Barreno *et al.*, 1989).

Além da existência de diferenças antigênicas entre os grupos, estudos demonstraram a existência de diferenças dentro dos grupos, possibilitando a divisão em subgrupos. A princípio foram identificados sete subgrupos do tipo A (A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7) e 4 subgrupos do grupo B (cepa B1, B2, B3, B4) (Anderson *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 1990).

A variação antigênica pode ser corroborada com o emprego de novas técnicas moleculares como o seqüenciamento de DNA. A análise de seqüências de nucleotídeos comprovam que o RSV apresenta variabilidade antigênica e genética (Sullender, 2000).

1.5. Epidemiologia

O vírus sincicial respiratório distribui-se mundialmente e atinge todas as faixas etárias. Apresenta uma sazonalidade que varia consideravelmente entre as regiões. Nas regiões subtropicais, o RSV tem um comportamento cíclico, com picos de

intensa atividade num período de 2 a 4 meses, coincidindo com o outono e inverno, seguido de circulação com menor atividade durante o resto do ano. Em climas temperados, mediterrâneo e deserto, o RSV está associado com estação fria enquanto que, em climas tropicais associa-se com estação chuvosa (Weber *et al.*, 1998).

No Brasil, na cidade de São Paulo, região sudeste subtropical, Vieira e colaboradores observaram o início do surto no final de março ou começo de abril, com pico no mês de maio, estendendo-se até o inverno (Vieira *et al.*, 2003). Em unidade de transplante de células troncos hematopoéticas (TCTH), Machado e col, também encontraram o pico do surto em maio, durante 3 anos seguidos na cidade de São Paulo (Machado *et al.*, 2004).

Na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, região do extremo sul do Brasil, onde o clima distingue-se das demais regiões do país devido as baixas temperaturas, a ocorrência de infecções respiratórias pelo HRSV são relatadas principalmente nos meses relacionadas a estação do inverno, especialmente junho e julho (Stralioetto *et al.*, 2001). Por outro lado, na região nordeste que apresenta clima tropical, Moura e colaboradores relatou o surto na estação chuvosa, na primeira metade do ano (Moura *et al.*, 2006).

Os dois tipos de RSV circulam anualmente ao mesmo tempo e na mesma área geográfica, pode ocorrer predomínio de cepas virais similares durante certo período epidêmico, ou de cepas totalmente diferentes em outros períodos (Garcia-Barreno *et al.*, 1989). Em geral, as cepas do grupo A são mais prevalentes na população (Bromberg *et al.*, 1991; Freymuth *et al.*, 1991).

A epidemia perde a força com a mudança de clima, aspectos comportamentais e a queda do número de pessoas susceptíveis ao longo da epidemia. A repetição dos surtos anualmente pode ser explicada pela grande circulação do vírus em todo planeta, pelos fatores acima relatados e pela

persistência do RSV em indivíduos imunocomprometidos e adultos com doença pulmonar obstrutiva crônica (Stensballe *et al.*, 2003).

1.6. Manifestações clínicas

Os fatores de risco para maior morbidade e mortalidade das infecções pelo RSV são a prematuridade, baixo-peso, displasia broncopulmonar, doença cardíaca congênita, imunodeficiência congênita ou adquirida, doenças oncohematológicas, TCTH e fibrose cística.

Em crianças, as manifestações clínicas variam de acordo com a idade. A infecção primária é geralmente sintomática até o segundo ano de vida e geralmente acomete o trato respiratório inferior. Embora a infecção pelo RSV seja rara nas primeiras quatro semanas de vida, surtos epidêmicos têm sido descritos em unidades de neonatologia. Nestas situações, taxas de ataque de cerca de 35% foram descritas em bebês hospitalizados por mais de seis dias (Hall *et al.*, 1979).

Em receptores de TCTH, os vírus respiratórios podem causar significativa morbidade, destacando-se o vírus respiratório sincicial, os vírus da Influenza A e B, os vírus da Parainfluenza, os adenovírus e os rinovírus. Recentemente, Martino e cols. em estudo prospectivo observaram a ocorrência do recém descrito metapneumovirus humano (HMPV) causando tanto infecções de trato respiratório alto como também pneumonias pós-TCTH (Martino *et al.*, 2005).

A integridade da imunidade celular e humoral é importante no controle de infecções. O transplante de células tronco-hematopoéticas é um procedimento que implica em um período longo de imunossupressão do paciente. Para o sucesso do transplante é necessário destruir os elementos imunoematopoéticos doentes da medula do receptor, procedimento conhecido como “condicionamento”, antes da infusão das células progenitoras que vão gerar um novo sistema imune no receptor.

A lenta reconstituição do sistema imunológico do paciente é a principal causa da grande morbidade em decorrência de episódios infecciosos nesta população.

Entre os vírus respiratórios, o RSV é responsável pela maior morbimortalidade nestes pacientes e o principal fator de risco para progressão para pneumonia é o tempo pós-transplante, estando sob maior risco os pacientes infectados antes da enxertia medular (Bowden, 1997; Harrington *et al.*, 1992).

A frequência com que cada um destes agentes é detectado durante os sintomas da doença pode variar em função dos surtos comunitários. O vírus respiratório sincicial tem sido detectado com maior frequência nos quadros de infecção respiratória diagnosticados no outono e inverno. Assim, Bowden e cols detectaram RSV em 35% das infecções virais respiratórias adquiridas na comunidade. Parainfluenza, rinovírus e influenza foram observados em 30%, 25% e 11% dos episódios sintomáticos, respectivamente (Bowden, 1997).

Em nosso meio, durante o ano de 2001, entre receptores de TCTH sintomáticos e cujo lavado de nasofaringe mostrou resultado positivo, o RSV foi detectado em 26.4%, influenza B em 25%, influenza A em 16.2% e parainfluenza em 10.3%. Cerca de 20% dos pacientes apresentaram co-infecção, sendo influenza A + B e RSV + influenza B as associações mais frequentemente observadas naquele ano. Dentre os pacientes com infecção respiratória alta pelo RSV, 55,5% evoluíram para pneumonia. Taxa de mortalidade de 6,6% foi observada nos pacientes com pneumonia por RSV (Machado *et al.*, 2003). Nos anos de 2002 e 2003 o RSV foi detectado em 27,1% e 23,5% do total de casos positivos por imunofluorescência direta, respectivamente (Machado *et al.*, 2004).

1.7. Diagnóstico Laboratorial das Infecções pelo RSV

Os métodos atualmente disponíveis para diagnóstico do RSV são: isolamento viral em cultura de células, detecção de antígenos com anticorpos monoclonais por

imunofluorescência ou por ensaio imunoenzimático (ELISA), testes rápidos, detecção de anticorpos de classes IgG e IgM específicos para o RSV, e detecção de ácidos nucleicos pela reação em cadeia por polimerase (PCR). Nessa última categoria incluem-se mais recentemente as detecções automatizadas por PCR em tempo real.

1.7.1. Isolamento em Cultura de Células.

O isolamento em cultura de célula foi considerado como padrão ouro por várias décadas até que mais recentemente, estudos demonstraram maior sensibilidade das técnicas com monoclonais e de PCR (Freymuth *et al.*, 2006; Kuypers *et al.*, 2006).

O RSV pode ser isolado em amostras de secreção respiratória através de aspirado ou lavado nasal ou de nasofaringe. A detecção em amostra coletada através de swab nasal é menos sensível no diagnóstico de RSV. Esta técnica de coleta deve ser evitada uma vez que resultados falsos negativos podem ocorrer em cerca de 30% dos casos (Macfarlane *et al.*, 2005).

Para o cultivo do vírus podemos empregar uma ampla variedade de linhagens celulares incluindo células HEp-2, HeLa, VERO e fibroblasto humano (HF, WI-38). Porém, os melhores sistemas foram as células HEp-2 e HeLa (Walsh & Hall, 1989).

É importante lembrar que o vírus é lábil, requerendo que as amostras sejam mantidas a baixas temperaturas, sem congelamento, e rapidamente inoculadas.

O RSV é presumido em cultura de células pelo efeito citopático característico, com formação de sincícios que ocorre três a sete dias após a inoculação. A confirmação deve ser feita com anticorpos monoclonais ou policlonais uma vez que a presença de outros vírus e mudanças bioquímicas do meio de cultura podem obscurecer o efeito (Arens *et al.*, 1986; Bromberg *et al.*, 1991). A detecção pode ser

feita mais rapidamente pelas técnicas de imunofluorescência e por Shell-vial (Hall *et al.*, 1975; Collins *et al.*, 2001).

1.7.2. Imunofluorescência.

A imunofluorescência é uma técnica utilizada para a pesquisa do RSV em células epiteliais da nasofaringe ou para a confirmação de isolamento viral. O teste apresenta elevada sensibilidade e especificidade, é de simples execução, porém requer leitura em microscópio de fluorescência. A subjetividade dos resultados, necessidade de mão-de-obra qualificada para a leitura e a não-automação são as desvantagens desta técnica.

As técnicas com anticorpos monoclonais são em geral mais sensíveis e rápidas que o isolamento viral, permitindo o diagnóstico em algumas horas após a coleta. As mais utilizadas nessa categoria são a imunofluorescência direta (IFD) ou indireta (IFI). Além destas, antígenos podem ser pesquisados por outros métodos como os ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Em estudo comparando a IFD e o isolamento viral, Shetty e cols observaram que a imunofluorescência foi significativamente mais sensível que o cultivo em 1069 amostras de “swab” de nasofaringe analisadas. Além disso, a demora dos resultados dos cultivos impediu que esta técnica tivesse grande impacto com relação à tomada de decisões clínicas, ao contrário da IFD (Shetty *et al.*, 2003).

Os “kits” comerciais das técnicas com monoclonais disponíveis permitem o diagnóstico de RSV A e B, influenza A e B, parainfluenza 1, 2 e 3 e adenovírus, sendo que para este último, a sensibilidade do teste é baixa. Vale aqui lembrar que uma amostra rica em células do epitélio respiratório é importante no diagnóstico por imunofluorescência, daí a importância de uma boa técnica de coleta do material.

1.7.3. Detecção de Ácidos Nucléicos

As técnicas moleculares (RT-PCR e PCR em tempo real) são atualmente as melhores opções no diagnóstico rápido das viroses respiratórias. Vários estudos demonstram a superioridade destas técnicas em comparação com o isolamento viral e a imunofluorescência (Freymuth *et al.*, 2006; Kuypers *et al.*, 2006). Além de menor custo em comparação com a IFD, as técnicas moleculares podem ser “desenhadas” de forma a incluir vários alvos para amplificação (PCR multiplex), permitindo o diagnóstico de vários vírus respiratórios na mesma reação (Freymuth *et al.*, 2006).

Para as reações de PCR, o processamento rápido das amostras ou seu congelamento a -80°C é recomendável uma vez que os vírus RNA (a grande maioria dos vírus respiratórios) degradam-se facilmente caso estes cuidados não sejam tomados.

1.7.4. Testes Rápidos

A rápida detecção do RSV tornou-se um importante fator para orientação terapêutica, principalmente em pacientes que apresentam maior risco de desenvolvimento de doença grave. Testes rápidos de diagnóstico foram desenvolvidos visando suprir a agilidade no diagnóstico mantendo a praticidade em sua manipulação. Porém, quando comparados a outras técnicas apresentaram resultados poucos satisfatórios. *Kits* comerciais de diagnóstico rápido como BD Directigen RSV (Becton Dickinson and Company), Bartels RSV DFA (Bartels Inc.) e VIDAS RSV assay (bioMérieux Inc), apresentaram menor sensibilidade quando comparados a outras técnicas incluindo isolamento em cultura celular (Cassiano-Colón *et al.*, 2003). Testes rápidos de imunocromatografia como o Xpect RSV (XP) e Binax Now RSV (BN) apresentam sensibilidade e especificidade comparáveis as técnicas imunofluorescência direta, entretanto o BN falha no diagnóstico de

amostras de pacientes adultos (Ohm-Smith *et al.*, 2004; Borek *et al.*, 2006). Alguns testes podem apresentar um número elevado de resultados falso-positivos, em outros casos os resultados obtidos necessitam ser confirmados por um outro teste (Kok *et al.*, 1990; Cassiano-Colón *et al.*, 2003).

1.7.5 Ensaios imunoenzimáticos

As técnicas imunoenzimáticas seguem os mesmos princípios da imunofluorescência e do radioimunoensaio, no entanto, é um método quantitativo baseado na utilização de antígeno ou anticorpo marcado com enzima onde a formação do complexo antígeno-anticorpo é controlada pela atividade enzimática. A degradação da enzima por um substrato fluorescente ou cromógeno amplia a capacidade de detecção teste elevando o nível de precisão e sensibilidade da técnica (Voller *et al.*, 1978).

O radioimunoensaio é um método mais sensível e reprodutível se comparado ao ELISA, mas apresenta algumas limitações: pouca estabilidade em seus reagentes devido a vida média dos radioisótopos, além do risco de exposição. Devido aos níveis de radiação presentes, a utilização de material radioativo implica em atender a trâmites burocráticos que elevam o seu custo.

O ELISA se comparado à IF, apresenta vantagens como a leitura objetiva e a possibilidade de automação, além de ser uma técnica quantitativa (Voller *et al.*, 1978).

O método de ELISA pode ser empregado na detecção de antígenos do RSV em amostras clínicas, congeladas ou não, de lavado nasal ou de *swabs* de nasofaringe (Krillov *et al.*, 1988; McIntosh *et al.*, 1982; Hendry *et al.*, 1986). Quando comparados com cultura de células e shell-vial, o ELISA apresenta 80.7% de sensibilidade enquanto que a cultura de células apresenta 58.4% e o shell-vial 77,6%, o que a torna uma alternativa válida para o diagnóstico rápido nos períodos

de circulação do RSV. No entanto, foi observado que a técnica apresenta restrições quando a pesquisa é realizada em amostras pediátricas (Pedneault *et al.*, 1994).

A técnica de ELISA é também amplamente utilizada na pesquisa de anticorpos. Possui alta sensibilidade e especificidade na detecção de diversas classes de imunoglobulinas quando comparado a outras técnicas como, por exemplo, a fixação do complemento (Menddens *et al.*, 1990).

O ELISA pode ser utilizado no diagnóstico de infecções através de soroconversão ou detecção de anticorpos classe IgM, na caracterização de infecção primária pela avaliação do índice de avidéz de anticorpos, no diagnóstico de reativações de infecções latentes pela ascensão de anticorpos classe IgG (Richardson *et al.*, 1978) e na caracterização do status imunológico do indivíduo frente a agentes específicos.

Esta última aplicação é fundamental na determinação da prevalência de determinada infecção em uma população e do risco de aquisição de certas infecções ou de reativação de infecções latentes que possam causar maior morbidade ou complicações em grupos especiais, tais como gestantes, pacientes submetidos a transplantes e pacientes com imunodeficiências congênitas ou adquiridas (James, 1990). Assim, receptores de transplantes de células tronco-hematopoéticas e seus respectivos doadores são submetidos à triagem sorológica pré-transplante para evitar a transmissão acidental a receptores soronegativos (James, 1990).

Ensaio imunoenzimáticos têm também sido utilizados na tipagem de cepas. A utilização de anticorpos monoclonais em ensaios imunoenzimáticos de competição, contra epítomos bem definidos do RSV, possibilita a tipagem das cepas virais, por meio de características determinadas antigenicamente por suas proteínas (Anderson *et al.*, 1986).

1.8. Resposta Imune

As células epiteliais respiratórias, principais alvos da infecção pelo RSV, são também a primeira linha de defesa na resposta imune inata contra o vírus, antes do envolvimento das células apresentadoras de antígenos tais como os macrófagos e as células dendríticas.

A ligação do vírus à célula do epitélio respiratório ativa os genes promotores para IL-6 e NF- κ B estimulando a transcrição de genes diretamente envolvidos na resposta antiviral, com produção de varias citocinas, quimiocinas e outras importantes proteínas imunomoduladoras. Entre estas se incluem o fator de necrose tumoral (TNF), IL-1 β , IL-2, IL-6, GM-CSF, G CSF, moléculas de adesão ICAM-1, VICAM-1, IL-8, entre outras. A ativação dos macrófagos presentes nos alvéolos por sua vez resulta na liberação de vários outros mediadores (Ogra, 2004). Estas moléculas são importantes no desencadeamento da cascata inflamatória e na mobilização de células para o local da infecção. Em geral, as infecções virais desencadeiam uma resposta com ativação de linfócitos CD4 tipo 1 (Th1) caracterizada pela produção de interferon gama e IL-2. Ao nascimento, a resposta inflamatória é normalmente mediada por linfócitos CD4 tipo 2 (Th2). Mais tarde esta resposta é substituída por uma resposta Th1, resultado de múltiplas exposições a agentes virais nos primeiros meses de vida. Quando ocorre a infecção pelo VRS há um desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, com predomínio da segunda. A resposta Th2 é caracterizada pelo recrutamento de células T e eosinófilos e pela liberação de mediadores inflamatórios solúveis, tais como histamina, cininas e leucotrienos (Hall, 2001).

Durante a infecção aguda, a destruição do epitélio expõe e ativa receptores irritativos que induzem a estimulação neurogênica da musculatura lisa dos brônquios levando ao broncoespasmo. Há uma perda de mediadores inibitórios e

da atividade colinérgica neural. Além do mais, o RSV aumenta os efeitos pró-inflamatórios da substância P, um neuropeptídeo com potente ação broncoconstritora, através do aumento da expressão e densidade de seus receptores específicos (NK1) nas células alvo. Assim, as manifestações clínicas da bronquiolite induzida pelo RSV são conseqüências não somente do efeito citopático direto do vírus, mas também da resposta inflamatória do hospedeiro (Collins, 2001).

A resposta imune humoral à infecção pelo RSV tem sido estudada especialmente em crianças. Nesta população, a infecção primária induz a formação de anticorpos classe IgM em 5 a 10 dias, que em geral persistem por um a três meses, embora em alguns estudos observou-se a persistência de IgM por pelo menos um ano (Ruuskanen & Ogra, 1993). Já os anticorpos classe IgG atingem níveis mais elevados de 20 a 30 dias após o início dos sintomas e declinam progressivamente chegando a níveis baixos um ano após a infecção primária. Episódios de reinfecção são freqüentes ao longo dos anos, em função da imunidade transitória induzida pelo RSV. Nestes episódios, um efeito “booster” se nota com títulos altos de IgG detectados de 5 a 7 dias após o início dos sintomas. Anticorpos da classe IgA também são detectáveis tanto no soro como em secreção de nasofaringe, livres ou associados às células epiteliais. A duração desta classe de anticorpos é curta, e são detectáveis somente por alguns meses após a infecção (Ogra, 2004).

Em adultos, os títulos séricos após repetidos episódios de infecção são elevados e geralmente mais duradouros (Crowe & Williams, 2003). Nesse grupo de pacientes um número significativamente menor de estudos avaliou a resposta imune humoral à infecção pelo RSV.

Dados preliminares demonstraram que idosos com concentração menor de anticorpos anti-RSV no momento da infecção apresentavam maior morbidade (Falsey *et al.*, 1998). Posteriormente, os mesmos autores compararam a

concentração média de anticorpos anti-glicoproteínas A e B e anti-proteína de fusão do RSV, em estudo envolvendo três grupos de pacientes: adultos saudáveis abaixo de 50 anos de idade, acima de 60 anos e adultos acima de 65 anos com alguma co-morbidade. Observaram então que os pacientes mais velhos apresentavam títulos maiores antes da infecção quando comparados aos pacientes mais jovens. Além disso, frente à infecção pelo RSV, 50% desses indivíduos mostraram uma ascensão de 4 vezes nos títulos de anticorpos em contraste com apenas 18% dos indivíduos mais jovens (Falsey *et al.*, 1999). Esses dados sugerem que a maior morbidade das infecções pelo RSV descrita em idosos não deve ser decorrente apenas de uma deficiência do sistema imune humoral e outras causas devem estar envolvidas.

Mais recentemente, outro estudo avaliando os fatores de risco para gravidade das infecções pelo RSV em adultos evidenciou que a presença de doença pulmonar crônica, incapacidade funcional (nas atividades do dia a dia) e baixa concentração de anticorpos neutralizantes estavam independentemente associadas à hospitalização por infecção pelo RSV (Walsh *et al.*, 2004).

Do exposto acima, compreende-se que o papel dos anticorpos anti-RSV na diminuição da gravidade da infecção é controverso. O uso de diferentes métodos de detecção de anticorpos nos estudos (ELISA, neutralização em placa, fixação de complemento, etc), de diferentes alvos de detecção (antígeno bruto, glicoproteínas, proteína de fusão), entre outros, aumenta ainda mais a discrepância dos resultados e reforça a indefinição do tema.

Em recém-nascidos, alguns estudos demonstram que a presença de anticorpos anti-RSV protege parcialmente contra a infecção. Assim, crianças que nascem com títulos altos de anticorpos neutralizantes maternos desenvolvem doença mais amena ou adquirem a infecção em uma idade maior em comparação com as que nascem com níveis baixos (Crowe & Williams, 2003; Hacimustafaoglu

et al., 2004). Em amostras de sangue de cordão umbilical, estudo recente demonstrou que a cada aumento de 1 log₂ na concentração de anticorpos neutralizantes observou-se uma redução de 30% no risco de hospitalização por infecção pelo RSV até o sexto mês de vida (Eick *et al.*, 2008). Outros autores, analisando anticorpos séricos subtipo-específicos, não observaram proteção contra infecção de trato respiratório baixo pelo RSV, independentemente do tipo e genótipo do RSV causando a infecção (Vieira *et al.*, 2007).

Após o nascimento, os anticorpos maternos declinam progressivamente e aos seis meses de idade, anticorpos neutralizantes são indetectáveis em crianças que não foram expostas ao RSV nesse período. Nas mesmas crianças, os anticorpos anti-proteína F declinaram de 86% de positividade ao nascimento para 43% e 21% de positividade aos 3 e 6 meses, respectivamente (Brandenburg *et al.*, 1997).

1.9. Justificativa do Estudo

A reconstituição imune pós-transplante de células tronco-hematopéticas assemelha-se de certa forma ao período pós-natal. Linfócitos T e B *naïves* e de memória oriundos do doador são infundidos no receptor e, uma vez ocorrida a enxertia, a resposta imune a um determinado agente infeccioso vai depender da existência ou não de memória imunológica do doador frente àquele antígeno.

A reconstituição imunológica se estabelece progressivamente, com recuperação primeiramente da imunidade inata, seguindo-se da recuperação da resposta imune mais elaborada de células T e posteriormente (até anos após) da resposta de células B (Storek, 2008).

Os anticorpos séricos do receptor no período pós-transplante vão progressivamente se extinguindo, da mesma forma que os anticorpos maternos nos primeiros meses de vida, com conseqüente perda da memória imune adquirida no passado e necessidade de revacinação desses pacientes após o transplante. O uso

de imunossupressores para profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro nos transplantes alogênicos torna essa reconstituição imunológica ainda mais lenta e comprometida.

Analisando a prevalência de vírus respiratórios em coortes de receptores de TCTH durante três anos consecutivos, Machado e cols. observaram uma menor probabilidade de infecção pelo RSV em pacientes que haviam adquirido RSV no ano anterior (Machado *et al.*, 2004). Uma possível justificativa para esta observação seria o desenvolvimento de resposta imune humoral após a infecção pelo RSV e a persistência desses anticorpos em níveis protetores, evitando a reinfecção em anos consecutivos.

Esses dados, somados às características peculiares dessa população com relação à reconstituição imunológica e à ausência de estudos sobre a resposta de anticorpos específicos para o RSV pós-TCTH, nos levaram a propor este estudo. O conhecimento do comportamento desses anticorpos pode ser útil para melhor compreensão da patogênese da infecção pelo RSV nesse grupo especial de pacientes.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivos primários

- 2.1.1. Desenvolver um ensaio enzimático (ELISA) para detecção de anticorpos anti-RSV em receptores de TCTH.
- 2.1.2. Investigar através dos resultados obtidos pelo ELISA, o padrão de resposta humoral em receptores de transplante de células tronco-hematopoéticas (TCTH) infectados pelo RSV.
- 2.1.3. Determinar o comportamento dos anticorpos anti-RSV antes e depois do TCTH em pacientes infectados e não infectados pelo RSV durante o seguimento.

2.2. Objetivos secundários

- 2.2.1. Avaliar a presença de anticorpos anti-RSV
- 2.2.2. Comparar a concordância entre o teste de ELISA desenvolvido com teste comercial de ELISA.

METODOLOGIA

3. Metodologia

3.1. Desenvolvimento do ELISA anti-RSV e teste de avides

3.1.1. Preparo do Antígeno

Para o preparo dos antígenos viral e controle foram utilizadas garrafas contendo monocamadas de células HEp-2 (câncer de laringe), mantidas em meio de cultura RPMI (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL®), adicionado de penicilina 100U/ml, estreptomicina 100 ug/ml e anfotericina B (2ug/ml).

As células utilizadas na produção do antígeno viral foram tripsinizadas, e após a formação de monocamadas confluentes de células, foram inoculadas com o RSV (cepa A2), para a produção do antígeno viral. O uso de tripsina na inoculação do HRSV, tem como objetivo facilitar a penetração dos vírus na camada celular.

As células que foram utilizadas na produção do antígeno viral foram inoculadas com RSV e mantidas à 37°C até a observação de efeito citopático característico sobre a monocamada de células confluentes e que esse efeito abrangesse quase a totalidade de sua extensão.

Com pérolas de vidro, as células foram desprendidas da parede da garrafa e lavadas 2 vezes com solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2 (PBS) estéril gelado. A seguir, as células infectadas foram rompidas por ultra som em banho de gelo e os antígenos solubilizados com desoxicolato de sódio a 0,25% durante 40 minutos a 4 °C. Após a sonicação o preparado foi centrifugado a 10.000 x g, durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi dividido em alíquotas e estocado a – 70°. Simultaneamente o controle foi preparado da mesma forma com células não infectadas. O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Lowry,

utilizando como padrão albumina de soro bovino (BSA) segundo o kit (BioRad, Hercules, EUA). As proteínas totais foram dosadas por espectrofotometria.

3.1.2. Titulação do Antígeno

As diluições ótimas do antígeno viral e o controle, para sensibilização das placas, foram determinadas por titulação em bloco, utilizando-se soros sabidamente positivos e negativos. A placa foi sensibilizada com 100µl das diluições seriadas do antígeno viral e o controle (1/20 a 1280). Em colunas alternadas da placa de microtitulação (NUNC-Polysorp), foram colocados 9,8 mg/ml de cada diluição do antígeno viral, seguidas das diluições correspondentes controle. As placas foram então incubadas a 4°C durante a noite, lavadas uma vez com PBST (PBS contendo 0,1% de Tween 20 e timerosal a 1:10.000).

Para bloqueio dos sítios livres de adsorção da placa, as placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C com 200µl de solução bloqueadora (SB), constituída de PBST contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). Após desprezar-se a solução bloqueadora, foram adicionados 100 µl de soro diluído a 1:100 em SB, nas cavidades contendo antígeno viral e controle. Após incubação a 37°C durante 1 hora, as mesmas foram lavadas 3 vezes com PBST e incubadas com 100µl de conjugado anti IgG humano com peroxidase (Sigma), diluído a 1:500 a 1: 4000 em SB. Após incubação a 37°C durante 40 minutos, as placas foram lavadas 4 vezes com PBST, adicionando-se a seguir, 100 µl de solução de substrato e cromógeno FAST O-fenilenodiamina (Sigma). Após incubação à temperatura ambiente, em câmara escura, durante 20 minutos, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 100µl de H₂SO₄ 2,5N, procedendo-se à leitura a 492 nm em espectrofotômetro de placas (Titertek Multiskan II).

Os resultados, expressos como ΔDO (Diferença de Densidade Óptica), foram calculados, subtraindo-se da absorbância da cavidade com antígeno viral, aquela obtida com o controle de células.

3.1.3. Determinação do ponto de corte do teste de ELISA

Para definir o ponto de corte do teste utilizaram-se 20 amostras de soro de crianças de 9 meses de idade, negativos para anticorpos anti-RSV, tituladas por imunofluorescência (kit Dako Denmark A/S). O valor de corte foi calculado com a média das absorbâncias (ΔDO) adicionado de três desvios padrões.

3.1.4. Definição de soro padrão

Para determinação da concentração de anticorpos em unidades arbitrárias (UA/mL) foi preparada uma mistura de soros de indivíduos adultos doadores de sangue positivos para anticorpos anti-RSV, com título de anticorpos estabelecido por IFA através diluições seriadas partindo da diluição inicial de 1:10 a 1:10.280, sendo o título de anticorpos estabelecido a 1:160. Uma vez estabelecido o soro padrão, a mistura foi dividida em alíquotas e mantida congelada a -20°C .

O soro padrão foi diluído em diluições seriadas de 1/100 a 1/12800 e testadas em triplicata. Após o cálculo da média das ΔDO s de cada diluição, construiu-se reta de regressão utilizando-se o programa Microsoft Excel 5.0 e posterior inferência da concentração de anticorpos em unidades arbitrárias.

A ΔDO correspondente ao valor de corte foi por convenção definida como tendo uma unidade arbitrária por ml (1UA/ml) de anticorpo e o título de anticorpos no soro padrão foi obtido pela recíproca da diluição correspondente.

3.1.5. Determinação de anticorpos IgG anti RSV e Teste de Avidéz

A determinação da avidéz de IgG através da técnica ELISA, foi realizada segundo técnica descrita por Souza et al (2001).

Em colunas alternadas da placa de microtitulação(NUNC-Polysorp), foram adicionados 100 µl da diluição ótima do antígeno viral (Anderson *et al* 1985; Mufson *et al* 1985), seguidas da diluição correspondente controle. As placas foram então incubadas a 4°C durante a noite, lavadas 1 vez com PBST e utilizadas no mesmo dia. Para bloqueio dos sítios livres de adsorção da placa, as placas foram inicialmente incubadas durante 1 hora a 37°C com 100µl de solução bloqueadora (SB), constituída de PBST contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). Após desprezar-se a solução bloqueadora, foram adicionados 100 µl de soro diluído a 1:100 em SB, em 2 cavidades contendo antígeno viral e duas com controle. Após incubação a 37°C durante 1 hora, as mesmas foram lavadas 2 vezes com PBST e incubadas com 100µl de PBST contendo ou não uréia 7M. Após duas novas lavagens, adicionaram-se, então, 100µl de conjugado anti IgG humano com peroxidase (Sigma), na diluição ótima (1:1.000), em SB. Após incubação a 37°C durante 40 minutos, as placas foram lavadas 4 vezes com PBST, adicionando-se a seguir, 100 µl de solução de substrato e cromógeno (peróxido de hidrogênio (Sigma) a 0,03% e O-fenilenodiamina (Sigma) a 0,4mg/ml em tampão citrato 0,1M, pH 5,0). Após incubação à temperatura ambiente, em câmara escura, durante 20 minutos, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 100µl de H₂SO₄ 2,5N, procedendo-se à leitura a 492 nm em espectrofotômetro de placas (Titertek Multiskan II).

Os resultados, expressos como ΔDO (Diferença de Densidade Óptica), foram calculados, subtraindo-se da absorbância da cavidade com antígeno viral,

aquela obtida com o controle de células. O índice de avides (I.A.) foi calculado segundo a equação:

$$\text{I.A. (\%)} = \frac{\Delta\text{DO COM URÉIA}}{\Delta\text{DO SEM URÉIA}} \times 100$$

Diluições seriadas do soro padrão foram incluídas em cada série de testes para a determinação da curva padrão pela reta de regressão. Os títulos de anticorpos dos soros dos pacientes em UA/ml foram estimados através de extrapolação das ΔDO s das cavidades sem tratamento com uréia na curva padrão. Foram consideradas positivas as amostras com títulos ≥ 100 UA/ml correspondente ao valor de corte multiplicado pelo fator de diluição.

3.2. Comparação entre o ELISA IMTSP e o ELISA comercial

Para comparação entre o ELISA desenvolvido no Laboratório de Virologia do IMTSP (ELISA IMTSP) e um teste de ELISA comercial (RIDASCREEN® RSV IgG, r-biopharm, Germany) foi utilizado o índice Kappa segundo Landis e Koch, interpretado conforme tabela abaixo (Landis & Koch, 1997).

Tabela 1. Classificação do índice Kappa.

Índice Kappa	Classificação
< 0	Sem concordância
0 - 0.20	Concordância pequena
0.21 - 0.40	Concordância insatisfatória
0.41 - 0.60	Concordância satisfatória
0.61 - 0.80	Concordância substancial
0.81 - 1.00	Concordância quase perfeita

O índice Kappa é baseado no número de amostras concordantes, ou seja, no número de amostras cujo resultado é o mesmo entre os ensaios. O Kappa é uma medida de concordância interobservador e mede o grau de concordância além do que seria esperado tão somente pelo acaso. Esta medida de concordância tem como valor máximo o “1”, valor que representa o máximo de concordância e o “0”, que indica ausência de concordância. Um eventual valor de Kappa menor que zero, sugere que a concordância encontrada foi menor do que aquela esperada por acaso.

3.3. População estudada

Foram analisadas amostras de soro de receptores de TCTH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), coletadas entre 2001 e 2002. As amostras de soro foram coletadas quinzenalmente como parte do programa de vigilância de citomegalovirus pós-TCTH (do condicionamento até o dia +120) e estocadas a -20°C no Laboratório de Virologia do IMTSP (LIM52 – HCFMUSP). Os pacientes não faziam uso profilático de imunoglobulina endovenosa.

Foram definidas duas coortes de pacientes: infectados (Casos) e não infectados (Controles) pelo RSV durante o acompanhamento pós-transplante. Os grupos foram definidos de acordo com os critérios descritos na tabela 2:

Tabela 2. Critérios para inclusão de casos e controles.

Casos	Controles
a) Diagnóstico de infecção respiratória pelo RSV por IFD em amostra de lavado nasal ou broncoalveolar.	a) Sintomas respiratórios com coleta de lavado nasal ou broncoalveolar e sem diagnóstico de infecção pelo RSV por IFD.
b) Disponibilidade de amostras de soro coletadas antes ou até uma semana após o TCTH (amostra “pré”).	b) Disponibilidade de amostras de soro coletadas antes ou até uma semana após o TCTH (amostra “pré”).
c) Disponibilidade de amostra de soro coletada antes do diagnóstico de RSV.	c) Disponibilidade de amostra de soro coletada antes dos sintomas respiratórios.
d) Duas amostras de soro coletadas após o quadro de infecção pelo RSV.	d) Duas amostras de soro coletadas após o aparecimento de sintomas que levaram à coleta de lavado nasal.

De acordo com estes critérios foram selecionados 15 casos e 29 controles. As características das coortes estudadas com relação ao tipo de transplante, sexo, doença de base e o regime de condicionamento estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Características dos pacientes infectados e não-infectados pelo RSV.

Variável		Infecção pelo RSV		P
		Casos (N=15)	Controles (N=29)	
Sexo	Masculino	9(20,5%)	15(34,1%)	0,6
	Feminino	6(13,6%)	14(31,8%)	
Tipo TCTH	Autólogo	3(6,8%)	4(9,1%)	0,6
	Alogênico	12(27,3%)	25(56,8%)	
Doença de base	LMC	6(13,6%)	8(18,2%)	0,7
	LMA	2(4,5%)	5(11,3%)	
	AAG	3(6,8%)	6(13,6%)	
	LLA	1(2,3%)	4(9,1%)	
	LNH	2(4,5%)	1(2,3%)	
	DH	0	2(4,5%)	
	Outros	1(2,3%)	3(6,8%)	
Condicionamento*	BUCY	5 (11,3%)	9 (20,5%)	0,6
	BUMEL	6 (13,6%)	10 (22,7%)	
	CY/TBI	2 (4,5%)	5 (11,3%)	
	Outros	2 (4,5%)	4 (9,1%)	

Valor de p calculado pelo teste do Qui-quadrado. LMC = leucemia mielóide crônica, LMA = leucemia mielóide aguda, AAG = anemia aplástica grave, LLA = leucemia linfocítica aguda, LNH = linfoma não - Hodgkin, DH = doença de Hodgkin; BUCY = busulfano e ciclofosfamida, BUMEL = busulfano e melfalano; CY/TBI = ciclofosfamida e irradiação corporal total. (*) em 43 pacientes com informação sobre condicionamento.

3.4. Resposta à infecção pelo RSV pela ascensão de anticorpos específicos

Resposta imune humoral à infecção pelo RSV foi definida pelo aumento de quatro vezes dos títulos de IgG em amostras de soro coletadas após infecção pelo RSV (amostras pós-RSV1 e pós-RSV2) quando comparadas com amostras coletadas antes da infecção pelo RSV (amostra pré-RSV).

3.5. Avaliação da dinâmica dos anticorpos anti-RSV pós transplante

A avaliação da dinâmica dos títulos de anticorpos anti-RSV pós-transplante foi feita em amostras de soro de casos e controles, coletados antes e após o TCTH. No período pós-transplante as amostras foram coletadas com medianas ao redor do primeiro, segundo e terceiro mês do transplante, período que melhor reflete a reconstituição imunológica destes pacientes.

3.6. Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado na Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias 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

3.7. Análise Estatística

Para comparação dos títulos de anticorpos nos diferentes grupos, foi empregado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Bonferroni utilizando-se o programa GraphPad Prisma v 3.0.

Para comparação entre o ELISA desenvolvido no Laboratório de Virologia do IMTSP (ELISA IMTSP) um teste de ELISA comercial (VIDASCREEN® r-biopharm) foi calculado o índice Kappa com o programa SPSS (versão 15.0) e o resultado interpretado segundo Landis e Koch (Landis & Koch, 1997).

A avaliação da homogeneidade das variáveis tempo-independentes dos casos e controles e das variáveis associadas à infecção pelo RSV foi feita pelo teste do chi-quadrado, utilizando-se o programa SPSS (versão 15.0).

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Preparo do ELISA

4.1.1. Titulação

As diluições ótimas do antígeno e do controle de células foram 0,098 mg/ml, com o conjugado a uma concentração de 1/1000.

4.1.2. Definição do Soro Padrão

O soro padrão foi estabelecido em 4800 unidades arbitrárias, por meio de uma reta de regressão, com as médias das densidades onde definimos de forma arbitrária em 100 unidades como limite de positividade da reação, calculada pela fórmula abaixo.

Tabela 4. Reta de regressão para definição do soro padrão em UA

	Y=UA/ml	lnY	X=DO	lnX	y=a+bx	UA/ml
1/100	0,01	-4,60517	1,410	0,344	-4,93	138
1/200	0,005	-5,29832	1,095	0,091	-5,35	211
1/400	0,0025	-5,99146	0,834	-0,182	-5,81	333
1/1600	0,00125	-6,68461	0,561	-0,578	-6,48	649
1/3200	0,000625	-7,37776	0,359	-1,024	-7,23	1374
1/6400	0,000313	-8,07091	0,231	-1,465	-7,97	2882
	0,000156	-8,76405	0,122	-2,104	-9,04	8427
inclinação=b		1,680557				
intercepto=a		-5,50373				
CUT-OFF			0,2	-1,609	-8,21	4800

Tendo sido estabelecido o soro padrão em unidades arbitrárias, todas as amostras foram ajustadas por uma curva de calibração calculada a cada ensaio, onde convertemos em unidades arbitrárias todas as amostras empregadas neste trabalho, de acordo com tabela 5:

Tabela 5. Reta de regressão para cálculo das amostras em UA.

Y=UI/ml	lnY	X=DO	lnX	UA/ml	Diluições
4800	8,476371	1,410	0,34359	3482	1/100
2400	7,78324	1,095	0,090754	2276	1/200
1200	7,090077	0,834	-0,18152	1441	1/400
600	6,39693	0,561	-0,57803	740	1/800
300	5,703782	0,359	-1,02443	349	1/1600
150	5,010635	0,231	-1,46534	167	1/3200
75	4,317488	0,122	-2,10373	57	1/6400
Inclinação=b	1,681896				
Intercepto=a	7,290436				

4.2. Avidez de anticorpos

Em todas as amostras, testadas em diferentes períodos do seguimento dos pacientes, detectou-se a presença de anticorpos de alta avides.

4.3. Comparação do ELISA IMTSP com ensaio comercial

Entre as 48 amostras de soro testadas, 19 (39,6%) foram positivas para a detecção de anticorpos anti-RSV por ambas as técnicas e 22 (45,8%) foram

negativas para a detecção de anticorpos anti-RSV por ambas as técnicas. A Tabela 6 mostra a concordância entre as técnicas.

Tabela 6. Comparação entre o ELISA IMTSP e o ELISA comercial.

		ELISA IMTSP		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA comercial	Positivo	19	4	23
	Negativo	3	22	25
	Total	22	26	48

($p < 0,0001$; IC 95%)

O índice de kappa foi de 0,707, portanto a concordância entre as técnicas foi considerada substancial.

4.4. Infecção pelo RSV na população estudada

A infecção pelo RSV ocorreu com mediana no d+24 do transplante variando do d -6 até o d+ 194. O diagnóstico em pacientes com sintomas respiratórios foi feito com frequência significativamente maior nos meses de outono e inverno quando comparado aos meses de primavera e verão. Dos 35 pacientes que apresentaram sintomas respiratórios nos meses de outono e inverno, 15 (42,9%) tiveram o diagnóstico de RSV, ao passo que dos 9 pacientes que apresentaram sintomas respiratórios nos meses de primavera e verão, nenhum teve o diagnóstico de RSV ($p=0,018$, teste exato de Fisher).

Tabela 7. Distribuição das infecções pelo RSV segundo a estação do ano.

Diagnóstico	Outono – Inverno	Primavera - Verão	Total
RSV positivo	15	0	15
RSV negativo	20	09	29
Total	35	09	44

(Teste exato de Fisher, $p = 0,018$)

Nenhuma das outras variáveis avaliadas como possível fator de risco para a infecção pelo RSV mostrou significância estatística na análise univariada pelo teste do Chi-quadrado de Pearson: sexo ($p=0,60$), doença de base ($p=0,69$), condicionamento ($p=0,57$), tipo de TCTH ($p=0,59$), ou título de anticorpos anti-RSV abaixo de 2750 UA/mL ($p=0,11$).

4.5. Resposta à infecção pelo RSV pela ascensão de anticorpos específicos

Para a análise da resposta imune humoral à infecção pelo RSV, foram selecionadas 45 amostras de 15 receptores de TCTH sintomáticos, em cujo lavado nasal detectou-se RSV por imunofluorescência direta.

As amostras de soro antes da infecção pelo RSV (amostras pré-RSV) foram coletadas com mediana de 49 dias antes do diagnóstico de RSV variando de um a 192 dias antes do diagnóstico. As amostras de soro após a infecção pelo RSV, (amostras pós-RSV1 e pós-RSV2), foram coletadas com mediana de 20 dias

(variando de 2 a 56 dias) e 53 dias (variando de 27 a 83 dias) após o diagnóstico de RSV, respectivamente.

A concentração de anticorpos anti-RSV em unidades arbitrárias (UA) no período pré-RSV variou de 1684 a 3311 UA/mL, com média de 2354 UA/mL. Após o diagnóstico de infecção pelo RSV, a média da concentração de anticorpos foi de 2725 UA/mL (variando de 1022 a 4135 UA/mL) nas amostras pós-RSV1, e de 2950 UA/mL (variando de 1600 a 4642 UA/mL) nas amostras pós-RSV2.

Nenhum paciente apresentou aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos específicos após a infecção pelo RSV. Desta forma, não foi possível analisar outras variáveis possivelmente envolvidas na ascensão ou não-ascensão de anticorpos específicos. A figura 4 mostra o comportamento dos anticorpos anti-RSV nos 15 pacientes analisados no presente estudo.

Figura 4. Anticorpos anti-RSV em receptores de TCTH antes e após o diagnóstico de infecção respiratória pelo RSV.

4.6. Dinâmica dos anticorpos anti-RSV pós-transplante

No período pré-TCTH, as amostras de soro nos casos e nos controles foram coletadas com mediana no d -42 variando entre 168 antes do TCTH até 5 dias após o TCTH. Nesse período, a concentração média de anticorpos anti-RSV foi de 2742 UA/mL, variando de 891 a 4639 UA/ mL. A mediana do tempo de coleta das amostras pré-TCTH foi de -35 e -44 dias nos casos e controles, respectivamente, com média de títulos de anticorpos anti-RSV de 2490 UA/mL e 2872 UA/mL nos casos e controles, respectivamente.

Após o transplante, três amostras foram avaliadas para cada paciente nos dois grupos: a primeira amostra pós-transplante foi coletada com mediana no d+12 (variando de 0 a 37 dias) e a concentração média de anticorpos anti-RSV foi de 2642 UA/mL variando de 962 a 4540 UA/mL. A segunda amostra pós-transplante foi coletada com mediana no d+59 (variando de 12 a 236 dias) e a concentração média de anticorpos anti-RSV foi de 2767 UA/mL. Por fim, a terceira amostra pós-transplante foi coletada com mediana no d+90 (variando de 37 a 273 dias) e a concentração média de anticorpos anti-RSV foi de 2642 UA/mL.

Nos pacientes infectados pelo RSV (casos), as medianas de tempo das 3 amostras analisadas foram d+14, d+52 e d+89 e os respectivos títulos de anticorpos foram 2457 UA/mL, 2715 UA/mL e 2950 UA/mL. Nos pacientes sem infecção pelo RSV (controles), as medianas de tempo das 3 amostras analisadas foram d+9, d+69 e d+93 e os respectivos títulos de anticorpos foram 2738 UA/mL, 2794 UA/mL e 2642 UA/mL. Não houve diferença estatística entre os dois grupos.

A figura 5 mostra a dinâmica dos anticorpos específicos em receptores de TCTH infectados e não infectados pelo RSV.

Figura 5. Dinâmica de anticorpos anti-RSV em receptores de TCTH.

DISCUSSÃO

5. Discussão

O vírus respiratório sincicial é responsável por importante morbidade em receptores de TCTH, especialmente no período que antecede a enxertia quando taxas de progressão para pneumonia acima de 70% têm sido descritas (Small *et al.*, 2002). Nesses pacientes, quadros pneumônicos graves necessitando ventilação mecânica geralmente apresentam alta mortalidade.

Em consequência disso, estudos visando o aperfeiçoamento das técnicas diagnósticas, o controle da transmissão, a prevenção e o tratamento das infecções pelo RSV vêm sendo realizados há décadas por pesquisadores de todo o mundo.

Com o intuito de detectar anticorpos anti-RSV em pacientes submetidos a TCTH, foi desenvolvido um teste enzimático facilmente aplicável em larga escala.

A reação de ELISA empregada neste estudo teve por base a técnica padronizada por Souza *et al* (1991). Essa metodologia *in house* foi previamente descrita para detecção de anticorpos anti-sarampo, demonstrando altas sensibilidade e especificidade (Souza *et al*, 1991).

Diversos estudos têm descrito variabilidade de resultados, quando são utilizados diferentes testes comerciais e diferentes técnicas de produção de antígenos e sensibilização de placas.

Um teste de ELISA realizado por Steinhoff *et al* (1980), que utilizou para sensibilização da placa reagentes comerciais, inicialmente empregados na técnica de fixação de complemento, demonstrou que o ELISA apresentou maior sensibilidade do que os testes considerados padrão (fixação de complemento e microneutralização) (Steinhoff *et al*, 1980).

Em dois aspectos a técnica de ELISA padronizada no IMTSP demonstrou vantagens, quando comparada à técnica de Steinhoff: a inoculação do RSV em

culturas celulares possibilita a obtenção de grandes quantidades de antígenos para sensibilização das placas, não sendo necessária a aquisição de antígenos comerciais. O outro aspecto é a rapidez na execução do nosso teste, visto que, o período de incubação dos soros no teste padronizado por Steinhoff é de 18 horas contra os 60 minutos utilizados no nosso teste.

Vantagem semelhante foi demonstrada quando comparada à reação descrita por Falsey *et al* (2002), na qual foi necessária a incubação *overnight* para obtenção de resultados adequados (Falsey *et al.*, 2002).

Além disso, devido à indisponibilidade de soro padrão de referência em unidades internacionais, optamos por determinar o título de anticorpos em unidades arbitrárias, utilizando-se como soro padrão, uma mistura de soros de doadores de sangue.

A conversão das densidades ópticas de cada amostra em unidades arbitrárias, utilizando-se uma curva padrão construída com diluições seriadas do soro padrão, e que foi incluída em cada momento de realização do teste de ELISA, foi importante para controle e ajuste da variabilidade inerente aos testes imunoenzimáticos, assim como para comparar os títulos de anticorpos dos grupos estudados.

Finalmente, nosso teste foi comparado a um ensaio comercial, para validação dos resultados obtidos. Quarenta e oito amostras de soro foram testadas nos dois ensaios, havendo concordância em 41 destas.

Esses resultados foram submetidos ao índice Kappa, que mede o grau de concordância além do que ocorreria pelo acaso. O índice obtido foi de 0,707 (numa escala em que o valor máximo é 1,00), demonstrando uma concordância substancial entre os ensaios e, portanto, uma aplicabilidade do teste aqui desenvolvido.

Embora a comparação do custo das técnicas não tenha sido proposta como um dos objetivos do presente estudo, a grosso modo estimamos que o custo do ELISA IMTSP tenha sido cerca de 1/10 do custo do teste comercial empregado.

Uma vez desenvolvida a reação e avaliada sua concordância com o teste comercial utilizamos essa nova ferramenta para determinar o comportamento dos anticorpos anti-RSV em receptores de TCTH.

Da mesma forma como observado em países do hemisfério norte de clima temperado, o RSV circula com grande atividade anualmente em São Paulo nos meses de outono e inverno (Machado *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2004, Vieira *et al.*, 2007). No presente estudo, observamos que o diagnóstico de RSV foi feito durante essas estações na totalidade dos casos, muito embora os pacientes tenham sido incluídos em função da disponibilidade de soros estocados, segundo critérios específicos.

Esta marcada sazonalidade, juntamente com o atual conhecimento dos fatores que aumentam o risco de infecção pelo RSV, permite que medidas preventivas possam ser intensificadas nesse período com bons resultados (Macartney *et al.*, 2000). Algumas dessas medidas incluem higienização das mãos, instituição de precauções de contato para pacientes sintomáticos até que o diagnóstico seja estabelecido, uso de técnicas rápidas para detecção de RSV, proibição de visitas de crianças abaixo de 12 anos de idade no hospital, entre outras (Leclair *et al.*, 1987, Raad *et al.*, 1997, Macartney *et al.*, 2000, Martino *et al.*, 2005, Siegel *et al.*, 2007).

Mais recentemente, a profilaxia com o palivizumab, um anticorpo monoclonal humanizado específico para RSV, vem sendo recomendada em algumas populações de risco durante o período de maior circulação deste vírus na comunidade. Assim, a Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo em Norma Técnica aprovada em 13/07/2007, indica e disponibiliza o palivizumab profilático em

aplicações mensais de 15mg/kg, entre os meses de abril a agosto, para os seguintes pacientes: crianças menores de um ano de idade que nasceram prematuras (idade gestacional $\leq$ 28 semanas, após a alta hospitalar; crianças menores de 2 anos de idade, portadores de patologia congênita com repercussão hemodinâmica importante ou com doenças pulmonar crônica da prematuridade, que necessitaram tratamento nos seis meses anteriores ao período de sazonalidade do RSV (Resolução SS-249 de 13/07/2007, publicada no DOE 14/07/2007).

O racional do uso profilático do palivizumab durante o período de maior circulação do RSV baseia-se em evidências de estudos preliminares de transferência de imunidade materna a neonatos reduzindo o risco de complicações das infecções pelo RSV (Olgilvie *et al.*, 1981; Glezen *et al.*, 1981).

A similaridade da extinção de anticorpos do receptor no período pós-transplante com a observada em neonatos, associada à lenta reconstituição imunológica em vigência de imunossupressão prolongada nos transplantes alogênicos, de certa forma justifica os resultados encontrados no presente estudo.

Observamos que a resposta às infecções pelo RSV em receptores de TCTH foi pobre. Nenhum paciente apresentou aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos anti-RSV, confirmando a demora da reconstituição imune humoral nesses pacientes (Lum, 1987, Storek, 2008). Esse aumento não foi observado em nenhuma das amostras tomadas pós-infecção pelo RSV, a primeira com mediana de 20 dias e a segunda com mediana de 53 dias.

Vinte dias é o tempo necessário para anticorpos específicos atingirem seu nível máximo após infecção primária pelo RSV. Nos episódios de reinfecção, que ocorreu na totalidade dos casos desse estudo como indicado pelo teste de avidéz, este intervalo é mais curto, entre 5 a 7 dias (Ogra 2004).

É possível que o caráter retrospectivo desse estudo tenha representado um obstáculo a uma interpretação mais correta dessa dinâmica. Deve-se considerar que as amostras foram selecionadas de acordo com a disponibilidade em estoque e não refletem necessariamente o tempo ideal para esta avaliação. Tanto as amostras pré como as amostras pós-infecção pelo RSV podem ter sido tomadas com intervalo muito longo em relação ao diagnóstico. Assim, no período pós-RSV analisado os anticorpos poderiam já estar decrescendo a níveis mais baixos e por isso não tenha sido possível detectar o aumento de quatro vezes. Entretanto, mesmo nos dois pacientes cujas amostras foram tomadas até o quinto dia do diagnóstico não se observou ascensão significativa dos títulos.

Mesmo em indivíduos imunocompetentes, a avaliação prospectiva desses anticorpos deve ser feita com cautela. Estudo conduzido em adultos imunocompetentes infectados e não-infectados pelo RSV evidenciou que os títulos de anticorpos específicos nos indivíduos não infectados se mantinham mais estáveis do que nos pacientes infectados pelo RSV. Nestes últimos, após aumento de até 8 vezes nos títulos de anticorpos anti-RSV, os autores observaram uma queda acentuada (de até 75%) dos anticorpos induzidos nos meses subseqüentes, mostrando que a imunidade induzida é de curta duração (Falsey *et al.*, 2006).

Como não há estudos prospectivos semelhantes em receptores de TCTH, tomaremos como base um estudo da dinâmica de anticorpos monoclonais humanizados anti-RSV (palivizumab) infundidos em receptores de TCTH, como um exercício de reflexão sobre os resultados obtidos.

Boeckh et al. estudaram prospectivamente a farmacocinética do palivizumab em dois grupos de pacientes. No primeiro grupo o palivizumab foi introduzido profilaticamente em receptores de TCTH sem evidência de infecção pelo RSV. No segundo grupo, os níveis de palivizumab foram detectados por ELISA em 13 pacientes com diagnóstico de RSV no dia da infusão (dia zero), e 7, 14, 21 e 28

dias após a infusão do palivizumab. Nesse último grupo, as concentrações médias de palivizumab decresceram de 362,8 µg/mL imediatamente após a infusão para 111,7 µg/mL, 70,4 µg/mL, 50,6 µg/mL, 23,9 µg/mL nos dias 7, 14, 21 e 28 da infusão do anticorpos monoclonal anti-RSV, respectivamente. A vida média sérica do palivizumab foi de 22,4 dias no grupo de uso profilático e 10,7 dias nos pacientes com infecção pelo RSV sugerindo uma ligação do palivizumab a sítios antigénicos do RSV presente nesses pacientes (Boeckh et al., 2001).

Embora o estudo acima descrito refira-se a detecção de anticorpos monoclonais humanizados infundidos em receptores de TCTH e não à resposta pós-infecção natural pelo RSV, é possível que o mesmo ocorra com os anticorpos naturalmente induzidos pós-infecção e uma eventual ascensão de títulos pode não ser detectada em decorrência da ligação dos anticorpos a epítomos do RSV. Assim, a não-resposta definida pela ausência de ascensão de anticorpos não necessariamente significa títulos não-protetores ou não-capazes de diminuir a morbidade destas infecções.

No presente estudo, não foi possível estabelecer um título de anticorpos anti-RSV nas amostras pré-transplante que pudesse ser considerado como protetor. As concentrações médias e as variações nos títulos foram semelhantes em pacientes com infecção pelo RSV e sem infecção pelo RSV.

Modelos animais de profilaxia das infecções por RSV com o palivizumab sugerem que títulos de palivizumab acima de 40 µg/mL conferem significativa atividade anti-RSV em ratos (Johnson *et al.*, 1997). Em humanos, tais níveis ainda não estão estabelecidos. Embora alguns autores sugiram determinados *cut-offs* como títulos mínimos necessários para impedir as infecções pelo RSV (Hacimustafaoglu *et al.*, 2004), a maioria dos estudos não conseguiu demonstrar consistentemente o nível de anticorpos que pode ser considerado protetor, em diferentes grupos de pacientes (Falsey *et al.*, 1999; Walsh & Falsey, 2004).

Com relação à dinâmica dos anticorpos anti-RSV pós-transplante, não foi possível identificar diferenças entre os indivíduos infectados e não infectados pelo RSV durante o seguimento. Embora a concentração média de anticorpos anti-RSV antes do transplante nos pacientes com RSV tenha sido menor que nos pacientes sem RSV, essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa.

No pós-transplante, as diferenças nos períodos avaliados também não se mostraram significantes. Conforme observado por Falsey *et al.* (2006), os pacientes não infectados pelo RSV apresentaram títulos de anticorpos mais estáveis do que nos pacientes infectados pelo RSV (Falsey *et al.*, 2006).

Embora sem diferença estatística, a infecção pelo RSV induziu a um discreto aumento nos títulos de anticorpos como pode ser observado na figura 5, fazendo que a média dos títulos de anticorpos fosse maior nesse grupo do que nos pacientes não infectados, após 80 dias de transplante (2950 UA/mL versus 2642 UA/mL, respectivamente).

O declínio dos títulos de anticorpos anti-RSV pós-transplante pode ser vista no grupo de pacientes não infectados, uma vez que nesse grupo os títulos ao final do período estudado ficaram abaixo dos títulos pré-transplante, ao contrário do que foi observado nos pacientes que se infectaram pelo RSV.

Para melhor avaliação da dinâmica dos anticorpos anti-RSV pós-TCTH são necessários estudos prospectivos abrangendo um número maior de pacientes, com amostras de sangue para pesquisa de anticorpos anti-RSV coletadas a intervalos regulares e mais curtos, desde o início do condicionamento até o primeiro ano do transplante.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- 6.1. O teste de ELISA desenvolvido no Laboratório de Virologia do IMTSP apresentou concordância substancial com o teste comercial VIDASCREEN[®] (r-biopharm), com índice Kappa de 0,707.
- 6.2. Receptores de TCTH com infecção pelo RSV não apresentaram aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos específicos por ELISA pós-infecção.
- 6.3. Os anticorpos anti-RSV detectados por ELISA decresceram no período pós-transplante, principalmente nos pacientes não-infectados.

REFERÊNCIAS

5. Referências Bibliográficas

Anderson, L. J.; Hierholzer, J.C.; Bingham, P.G.; Stone, Y.O.;
Microneutralization test for respiratory syncytial virus based on an
enzyme immunoassay. **J Clin Microbiol**. 1985; 22(6): 1050–1052.

Anderson LJ, Hierholzer JC, Stone YO, Tsou C, Fernie BF. Identification
of epitopes on respiratory syncytial virus proteins by competitive binding
immunoassay. **J Clin Microbiol**. 1986; 23(3): 475-480.

Arens M.Q, Swierkosz EM, Schmidt R R, Armstrong T. Rivetna K.
Enhanced Isolation of Respiratory Syncytial Virus in Cell Culture. **J Clin
Microbiol** 1986; 23(4): 800-802.

Anderson LJ. Major trends in nosocomial viral infections. **Am J Med**.
1991; 16;91(3B):107S-111S.

Beem M, Wright FH, Hamre D, Egerer R, Oehme M. Children.
Association of the chimpanzee coryza agent with acute respiratory
disease in children **N Engl J Med**.1960; 263 (15):523-530.

Boeckh M, Berrey MM, Bowden RA, Crawford SW, Balsley J, Corey L.
Phase 1 evaluation of the respiratory syncytial virus-specific monoclonal
antibody palivizumab in recipients of hematopoietic stem cell transplants.
J Infect Dis 2001; 1;184(3):350-4.

Borek AP, Clemens SH, Gaskins VK, Aird DZ, Valsamakis A. Respiratory syncytial virus detection by Remel Xpect, Binx Now RSV, direct immunofluorescent staining, and tissue culture. **J Clin Microbiol.** 2006; 44(3):1105-7.

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

Brandenburg AH, Groen J, van Steensel-Moll HA, Claas EC, Rothbarth PH, Neijens HJ, Osterhaus AD. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. **J Med Virol.** 1997; 52(1):97-104.

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

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

Casiano-Colón AE, Hulbert BB, Mayer TK, Walsh EE, Falsey AR. Lack of sensitivity of rapid antigen tests for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults. **J Clin Virol.** 2003; 28(2):169-74.

Chanock RM, Roizman B, Myers R. Recovery from Infants with Respiratory Illness of Virus related to Chimpanzee coryza Agent. I. Isolation, properties and characterization. **Am J Hyg.** 1957a; 66:281-90.

Chanock R, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. **Am J Hyg.** 1957b; 66(3):291-300.

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

Collins, P. L., M. G. Hill, and P. R. Johnson. The two open reading frames of the 22K 71:3015- mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. **J. Gen. Virol.** 1990; 71 (Pt 12):3015-20.

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

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

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

Coates HV, Forsyth BR, Chanock RM. Biophysical Studies of Respiratory Syncytial Virus I. Density of Respiratory Syncytial Virus and Associated Complement-Fixing Antigens in a Cesium Chloride Density Gradient. **J Bacteriol.** 1966; 91(3): 1263–1269.

Crowe JEr, Williams JV. Immunology of viral respiratory tract infection in infancy. **Paediatr Respir Rev.** 2003; 4(2): 12-119.

Eick A, Karron R, Shaw J, Thumar B, Reid R, Santosham M, O'Brien KL. The Role of Neutralizing Antibodies in Protection of American Indian Infants Against Respiratory Syncytial Virus Disease. **Pediatr Infect Dis J.** 2008; 27(3):207-212.

Falsey AR, Walsh EE, Looney RJ, Kolassa JE, Formica MA, Criddle MC, Hall WJ. Comparison of respiratory syncytial virus humoral immunity and response to infection in young and elderly adults. **J Med Virol.** 1999; 59(2):221-6.

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

Falsey AR, Singh HK, Walsh EE. Serum antibody decay in adults following natural respiratory syncytial virus infection. **J Med Virol.** 2006; 78(11):1493-7.

Freymuth F, Petitjean J, Pothier P, Brouard J, Norrby E. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups A and B in France from 1982 to 1990. **J Clin Microbiol.** 1991; 29(3):653-5.

Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, Gouarin S, Petitjean J, Eckart P, Brouard J. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. **J Med Virol.** 2006; 78(11):1498-504.

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

Glezen 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(5):708-15.

Storek J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation – its relation to the contents of the graft. **Expert Opin Biol Ther.** 2008; 8(5):583-97.

Hacimustafaoglu M, Celebi S, Aynaci E, Sinirtas M, Koksai N, Kucukerdogan A, Ercan I, Goral G, Ildirim I. The progression of maternal RSV antibodies in the offspring. **Arch Dis Child**. 2004; 89(1):52-3.

Hacking, D; Hull, J. Respiratory Syncytial Virus – Viral Biology and the Host Responses. **J. Infection**. 2002; 45:18 – 24.

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

Hall CB, Kopelman AE, Douglas RG Jr, Geiman JM, Meagher MP. Neonatal respiratory syncytial virus infection. **N Engl J Med**. 1979; 22;300(8):393-6.

Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, Anderson LJ. 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. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. **N Engl J Med**. 2001; 344(25): 917-1928.

Harrington RD, Hooton TM, Hackman RC et al. An outbreak of respiratory syncytial virus in a bone marrow transplant center. **J Infect Dis**; 1992; 165:987-993.

Hendry RM, Pierik LT, McIntosh K. Comparison of washed nasopharyngeal cells and whole nasal secretions for detection of respiratory syncytial virus antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol**. 1986; 23(2):383-4.

James K. Immunoserology of infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**. 1990; 3(2):132–152.

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

Kok T, Barancek K, Burrell CJ. Evaluation of the Becton Dickinson Directigen test for respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. **J Clin Microbiol**. 1990; 28(6):1458-9.

Krilov LR, Marcoux L, Isenberg HD. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays and a direct fluorescent-antibody test for detection of respiratory syncytial virus antigen. **J Clin Microbiol**. 1988; 26(2):377-9.

Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang ML, Cent A, Corey L, Morrow R. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays

for diagnosis of respiratory virus infections in children. **J Clin Microbiol.** 2006; 44(7):2382-8.

Landis JR, Koch GG. "The measurement of observer agreement for categorical data." **Biometrics.** 1997; 33:159-174

Leclair JM, Freeman J, Sullivan BF, Crowley CM, Goldmann DA. Prevention of nosocomial respiratory syncytial virus infections through compliance with glove and gown isolation precautions. **N Engl J Med.** 1987;317(6):329-34.

Lum LG. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. **Blood** 1987; 69: 369 - 380.

McIntosh K, Hendry RM, Fahnestock ML, Pierik LT. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of respiratory syncytial virus infection: application to clinical samples. **J Clin Microbiol.** 1982; 16(2):329-33.

Meddens MJ, Herbrink P, Lindeman J, van Dijk WC. Serodiagnosis of respiratory syncytial virus (RSV) infection in children as measured by detection of RSV-specific immunoglobulins G, M, and A with enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol.** 1990; 28(1):152-5.

McDonald TP, Jeffree CE, Li P, Rixon HW, Brown G, Aitken JD, MacLellan K, Sugrue RJ. Evidence that maturation of the N-linked

glycans of the respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins is required for virus-mediated cell fusion: The effect of alpha-mannosidase inhibitors on RSV infectivity. **Virology**. 2006; 350(2):289-301.

Macfarlane P, Denham J, Assous J, Hughes C. RSV testing in bronchiolitis: which nasal sampling method is best? **Arch Dis Child**. 2005; 90(6):634-5.

Machado C M, Vilas Boas L S, Mendes A V A, Santos M F M, Rocha I F, D Sturaro, Dulley F L, Pannuti C S. Low mortality rates related to respiratory virus infections after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**. 2003; 31 (2): 695 – 700.

Machado CM, Vilas Boas LS, Rocha IF, Pannuti CS. Prevalence of respiratory vírus infection in BMT recipients during three consecutive years in São Paulo, **Brazil**. **Int J Infect Dis**. 2004; 8:S29.

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

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

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

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

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

.Mufson, M,A.; Orvel, C. I.; Rafnar, B.; Norrby, E.. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **J.Gen.Virol**. 1985; 66:2111-2124.

Ogilvie MM, Vathenen AS, Radford M, Codd J, Key S. Maternal antibody and respiratory syncytial virus infection in infancy. **J Med Virol**. 1981;7(4):263-71.

Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. **Paediatr Respir Rev**. 2004; 5(SA):119-126.

Ohm-Smith MJ, Nassos PS, Haller BL. Evaluation of the Binax NOW, BD Directigen, and BD Directigen EZ assays for detection of respiratory syncytial virus. **J Clin Microbiol**. 2004; 42(7):2996-9.

Pedneault L, Robillard L, Turgeon JP. Validation of respiratory syncytial virus enzyme immunoassay and shell vial assay results. **J Clin Microbiol.** 1994; 32(11):2861-4.

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

Richardson L S, Yolken R H, Belshe R B, Camargo E, Kim H W, Chanock R M. Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of serological response to respiratory syncytial virus infection. *Infect Immun.* 1978; 20(3): 660–664

Rueda P, Delgado T, Portela A, Melero JA, García-Barreno B. Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies. **J Virol.** 1991; 65(6): 3374-3378.

Ruuskanen O, Ogra PL. Respiratory syncytial virus. **Curr Probl Pediatr.** 1993; 23(2):50-79.

Shetty AK, Treynor E, Hill DW, Gutierrez KM, Warford A, Baron EJ. Comparison of conventional viral cultures with direct fluorescent antibody stains for diagnosis of community-acquired respiratory virus infections in hospitalized children. **Pediatr Infect Dis J.** 2003; 22(9):789-94.

Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L; Health Care Infection Control Practices Advisory Committee. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. **Am J Infect Control**. 2007; 35(10 Suppl 2):S65-164.

Slinger R.; Milk R.; Gaboury, I.; Diaz-Mitoma, F. 2 Evaluation of the QuickLab RSV Test, a New Rapid Lateral-Flow Immunoassay for Detection of Respiratory Syncytial Virus Antigen **J Clin Microbiol**. 2004; 42(8): 3731–3733

Small TN, Casson A, Malak SF, Boulad F, Kiehn TE, Stiles J, Ushay HM, Sepkowitz KA. Respiratory syncytial virus infection following hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**. 2002; 29: 321–327.

Souza VA, Pannuti CS, Sumita LM, Albrecht P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measles antibody. A comparison with haemagglutination inhibition, immunofluorescence and plaque neutralization tests. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 1991; 33(1):32-6.

Souza VA, Pannuti CS, Sumita LM, de Andrade Júnior HF. Enzyme-linked immunosorbent assay-IgG antibody avidity test for single sample serologic evaluation of measles vaccines. **J Med Virol**. 1997; 52(3):275-9.

Steinhoff MC, Hall CB, Schnabel KC. Respiratory syncytial virus serology by a simplified enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol.** 1980; 12(3):447-50

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

Storek J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation - its relation to the contents of the graft. **Expert Opin Biol Ther.** 2008; 8(5):583-97.

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

Sullender WM, Mufson MA, Anderson LJ, Wertz GW. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. **J Virol.** 1991; 65(10): 5425-5434.

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

Sullender W M. Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic DiversityClin **Microbiol Rev.** 2000; 13(1): 1–15

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

Vieira SE, Gilio AE, Miyao CR, Pahl MM, Lotufo JP, Hein N, Betta SL, Durigon EL, Botosso V, Ejzenberg B, Okay Y. Nosocomial respiratory syncytial virus infection in a pediatric ward. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 2003; 24(7):468-9.

Vieira SE, Gilio AE, Durigon EL, Ejzenberg B. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus in infants: the role played by specific antibodies. **Clinics.** 2007; 62(6):709-16.

van Bleek GM, Poelen MC, van der MR, Brugghe HF, Timmermans HA, Boog CJ, Hoogerhout P, Otten HG, van Els CA. Identification of Immunodominant Epitopes Derived from the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein That Are Recognized by Human CD4 T Cells. **J Virol.** 2003; 77(2):980-988.

Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. **J Clin Pathol.** 1978; 31(6):507-520

Walsh EE, Hall CB, Schlesinger JJ, Brandriss MW, Hildreth S, Paradiso P. Comparison of antigenic sites of subtype-specific respiratory syncytial virus attachment proteins. **J Gen Virol.** 1989; 70 (Pt 11):2953-61.

Walsh, E. E.; Falsey, A. R. Age related differences in humoral immune response to respiratory syncytial virus infection in adults. **J. Med. Virol.** 2004; 73:295 – 294.

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

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