CESAR AUGUSTO DO NASCIMENTO

**Detecção do Vírus Respiratório Sincicial Humano
(HRSV) pela RT-PCR em tubo único,
em amostras clínicas**

**Detecção do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV)
pela RT-PCR em tubo único, em amostras clínicas**

CESAR AUGUSTO DO NASCIMENTO

Dissertação (Mestrado) apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP
/ Instituto Butantan / IPT, para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2006

**Detecção do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV)
pela RT-PCR em tubo único, em amostras clínicas**

CESAR AUGUSTO DO NASCIMENTO

Dissertação (Mestrado) apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP /
Instituto Butantan / IPT, para obtenção
do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração:
Biotecnologia

Orientador:
Profa. Dra. Viviane Fongaro Botosso

São Paulo
2006

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Nascimento, César Augusto.

Detecção do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) pela RT-PCR em tubo único, em amostras clínicas / Cesar Augusto Nascimento. -- São Paulo: 2006.

Orientador: Viviane Fongaro Botosso.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Virologia clínica e molecular.

Versão do título para o inglês: Single-Tube Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for diagnosis of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in clinical samples.

Descritores: 1. Vírus respiratório sincicial humano 2. Reação em cadeia pela polimerase 3. Diagnóstico rápido 4. Virologia Molecular 5. *Paramyxoviridae*. 6. Imunofluorescência indireta I. Botosso, Viviane Fongaro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB062/2006

Autorização para Reprodução

Para fins acadêmicos e científicos () **está autorizada**, a partir de ____/____/____ a reprodução () total ou () parcial por processos fotocopiadores e a partir ____/____/____ a disponibilização () total ou () parcial em meios eletrônicos,

Se parcial, discriminar paginação, ilustração, etc

() está autorizada

() não está autorizada

Assinatura do Autor:

Assinatura do Orientador:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan,
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): César Augusto do Nascimento

Título da Dissertação: **Deteccção do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV)
pela RT-PCR em tubo único, em amostras clínicas**

Orientador(a): Viviane Fongaro Botosso

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa de **Dissertação de Mestrado**, em
sessão pública realizada a/...../....., considerou,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 30 de maio de 2005.

PARECER 649/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação a Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, em sua quinquagésima quinta reunião, realizada no dia 25-maio-2005, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "Padronização da RT-semi Nested-PCR em tubo único para o diagnóstico do vírus respiratório sincicial humano (HRSV) em amostras clínicas".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**, com a recomendação de que no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido já aprovado, o item 3 que trata das coletas, seja alterada de forma a não incluir o texto apenas para este estudo. Tendo em mente que a identificação e o material genético do voluntário devem ser pré-estabelecidos.

Exatamente a V.Sa. que de acordo com o item 12 do mesmo, relatório de ciência projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Vicente Buzza
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB / USP

Ilmo. Sr.
CESAR AUGUSTO DO NASCIMENTO
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Do sonho à felicidade

**Um sonho
A fé
A busca
A perseverança
A oportunidade
O esforço
A dedicação
A realização
A felicidade**

Um novo sonho...

César Augusto

Dedicatórias

A Silene, minha querida e maravilhosa mãe

Por tudo que sou e o que fez para que eu chegasse até aqui.

Devo minha vida a você...Te amo mamãe!!!

Ao Olavo, meu pai (*in memorium*)

...pelos ensinamentos que me fizeram ver o mundo
de outra maneira.

Aos Meus queridos e maravilhosos irmãos:

Olavinho, Flávio, Carolina e Marco

Pela companhia e por estar presente na minha vida.

"Minha família, meu bem precioso, amo todos vocês"

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos...

A minha orientadora Profa. Dra. Viviane Fongaro Botosso, por ter me orientado de maneira tão sensata e inteligente, permitindo com que este sonho tornasse realidade, pelos inúmeros ensinamentos que levarei comigo sempre, por ter sido compreensiva e flexível na minha disponibilidade de horário, por me dar todo apoio que precisei e por me mostrar que a humildade está acima de qualquer coisa. Vivi, você não foi somente uma orientadora, mas um exemplo de competência, profissionalismo e de professora. Muito obrigado por tudo.

Ao Profº Dr. Edison Luiz Durigon que abriu a porta do seu laboratório dando-me oportunidade de fazer parte da sua equipe e mais do que isso me orientando não só para a pesquisa científica, mas para a vida. Meus eternos agradecimentos.

A Solange Cristina Silva (Sol), minha ex-chefe, pelo apoio e força que me permitiram chegar até a conclusão desse trabalho, saiba que o mundo só vale a pena porque existem pessoas como você. Continue assim, sempre.

A Priscila Comone (Pri), não somente companheira, mas amiga de laboratório no qual passamos junto todo esse tempo, obrigado pelos ensinamentos, pela ótima recepção que tive e por cada ponteira repostada, você ajudou a construir esse trabalho.

A Danila Vedovello, amiga de laboratório no qual estive sempre ao meu lado e que nunca mediu esforços para me ajudar, aprendi com você que a pesquisa pode ser feita de maneira séria, mas com um toque de bom humor e alegria.

As “meninas” do laboratório: Mariana, Elda e Patrícia, pela ajuda constante que me deram ao longo dessa caminhada. Vocês fazem do laboratório da “Vivi” o ambiente mais agradável para se fazer pesquisa.

A equipe do HRSV que tornaram este trabalho possível: Andréa L. Leal, Thereza S. Souza, Dra. Sandra E. Vieira e todas as funcionárias do HU-USP, pela ajuda na colheita e no diagnóstico das amostras clínicas.

A Claudia Trigo. P. Moraes, pelo esforço e dedicação intensa que teve em fazer a titulação na cultura de células, possibilitando a conclusão desse trabalho.

Ao meu amigo Luciano M. Thomazelli, pelo aprendizado que tive e pelo amigo que sempre foi.

A minha grande amiga doutoranda Patrícia Bosso (Paty), por todos os momentos que passamos juntos e por ter me concedido a alegria de ter sua amizade.

A todos os amigos e amigas do laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelos ensinamentos e pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

As minhas amigas Lílian (Lili), Hildener Nogueira e “Carolzinha” pela atenção que sempre me deram e pelos momentos de risadas.

A todos os professores desde a graduação que me ensinaram algo para que eu pudesse chegar até aqui, sem os quais não teria chegado.

Aos meus grandes amigos Anderson C. Lazinho, Danilo Marcondes (Dani), Edcarlos Marcelino (Eddy), Michele Lopes (Mi) e Rogério Vargas (Rô) por me agüentar todo esse tempo em que não pude dar a atenção que vocês merecem (desculpa), pela amizade verdadeira que vocês me proporcionam, pelos momentos de alegria, tristeza e tantos outros que passamos juntos. Vocês são especiais na minha vida.

Aos funcionários da microbiologia do ICB-USP: Maria Jacinta (nota 10), José M Lopes (Zé), Aninha, Naide, Carlos A. Silva (biotério), Fabiana L. A. Silveira, e da Biotecnologia Eliane, Fábria, Rodrigo e Miquéias, por tudo que fizeram por mim.

Aos exemplos do laboratório que devem ser seguidos: César A. Dinóla Pereira (grande César Pai), Danielle B. L. de Oliveira (Dani Bruna), Lurdes V. Lima (Lurdinha), e Alexandre Lourenço (Alê).

A minha querida “Malu” Maria Luisa Barbosa, por ter dedicado muitas horas do seu rico e precioso tempo me aconselhando quando entrei no laboratório e pelas infinitas correções neste trabalho.

Aos Professores Dra. Charlotte Mariana Hársi, Paolo Zanoto e Dra. Silvana Beres Castrignaro pela qualificada e exemplar condução que tiveram na minha banca de qualificação.

As bibliotecárias do ICB-USP Maria J. J. Carvalho e Eva Ap. S. Oliveira, pela correção e formatação deste trabalho.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, seja incentivando, dando conselhos, alegrias, broncas e até não fazendo nada, mas simplesmente estando ao meu lado.

RESUMO

NASCIMENTO, C. A. **Deteção do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) pela RT-PCR em tubo único, em amostras clínicas.** 139 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantan, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O vírus respiratório sincicial humano (HRSV) é principal agente causador de infecções do trato respiratório inferior em crianças e lactentes. Um diagnóstico rápido e preciso evitaria o uso desnecessário de antibióticos, nos casos em que a infecção é viral. A reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) e o ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) são considerados ferramentas importantes na detecção do HRSV, pela alta sensibilidade e especificidade. Visando simplificar e minimizar os riscos de contaminação frequentes, em duas etapas, foi padronizada uma reação em tubo único para detecção do HRSV em amostras clínicas. Aspirados de nasofaringe de 226 crianças de 0-5 anos de idade, com doença respiratória, atendidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), foram testados por imunofluorescência indireta, RT semi *Nested* PCR e RT-PCR em tubo único. Cento e duas amostras (45,1%) foram positivas em pelo menos uma das técnicas e 75 (33,2%) em todas. Três (1,3%) amostras foram positivas por IFI e RT semi *Nested* PCR, 1 (0,4%) foi positiva por IFI e RT-PCR em tubo único, 5 (2,2%) amostras foram positivas somente por IFI, 2 (0,9%) somente por RT semi *Nested* PCR e 16 (7,1%) amostras foram positivas pela RT semi *Nested* PCR e RT-PCR em tubo único. A RT-PCR em tubo único mostrou ser uma técnica rápida, sensível e específica, e o uso combinado de dois métodos aumenta a detecção do HRSV.

Palavras-chave: Vírus respiratório sincicial humano; Reação em cadeia pela polimerase; Diagnóstico rápido; Virologia Molecular; *Paramyxoviridae*.

ABSTRACT

NASCIMENTO, C. A. **Single-Tube Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for diagnosis of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in clinical samples.** 139 f. Master thesis (Science) – Instituto Butantan, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Respiratory Syncytial Virus is the main cause of acute lower respiratory tract infection (ALTRs) in infants, elderly and immunodepressed patients. Rapid diagnosis of Respiratory Syncytial Virus (RSV) infection is necessary to efficient treatment, avoiding the unnecessary use of antibiotics and determining patient isolation requirements. The reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and indirect immunofluorescence assay (IFA) methods have been referred as important tools for virus detection considering the high sensitivity and specificity, respectively of such methods. In order to maximize the simplicity and minimize the risk of sample cross-contamination by two steps RT-PCR, we developed a RT-PCR using a single-tube to detect HRSV in clinical samples. Nasopharyngeal aspirates (Nas) of 226 patients with acute respiratory illness, ranging 0-5 years old, were collected at the University of São Paulo Hospital (HU-USP) in São Paulo city. Samples were tested by indirect immunofluorescence assay, RT semi *Nested* PCR and single-tube RT-PCR. One hundred two (45,1%) of the 226 samples were positive at least by one of the three methods tested and 75 (33,2%) were positive by all methods. Three (1,3%) samples were positive only by IFI and RT semi *Nested* PCR, 1 (0,4%) sample were positive only by IFI and RT-PCR single-tube, 5 (2,2%) were positive only by IFI, 2 (0,9%) were positive only by RT semi *Nested* PCR and 16 (7,1) were positive only RT semi *Nested* PCR and RT-PCR single-tube. RT-PCR single-tube, showed to be fast, sensitive and specific for diagnosis of RSV and the combined use of both methods enhanced HRSV detection.

Key-word: Human respiratory syncytial virus; Polymerase chain reaction; Rapid diagnosis; Molecular Virology; Paramyxoviridae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos Membros da Família <i>Paramyxoviridae</i>	28
Figura 2. Modelo Representativo do Vírus Respiratório Sincicial Humano	29
Figura 3. Fotomicrografia do Vírus Respiratório Sincicial Humano	29
Figura 4. Esquema do Genoma do HRSV.....	30
Figura 5. Representação Esquemática da Glicoproteína F	34
Figura 6. Representação Esquemática da Glicoproteína G	36
Figura 7. Mapa Genético do RNA Genômico do HRSV	38
Figura 8. Esquema da Estratégia de Transcrição, Tradução e Replicação do Genoma dos Vírus da Família <i>Paramyxoviridae</i>	41
Figura 9. Fluxograma dos trabalhos realizados em laboratório a partir do material clínico colhido no HU-USP	63
Figura 10. Esquema de distribuição das amostras de material clínico nas lâminas de triagem e identificação	66
Figura 11. Esquema do genoma viral e emparelhamento dos <i>primers</i>	69
Figura 12. Esquema da placa com cultura de células HEp-2 inoculadas com diluições seriadas das amostras virais padrão	74
Figura 13. Fotografia da IFI de células HEp-2	81
Figura 14. Eletroforese dos produtos da RT-PCR em tubo único para o gene G e F	82

Figura 15. Eletroforese dos produtos da RT-PCR em tubo único para o gene G e F. Titulação de <i>primers</i>	83
Figura 16. Eletroforese dos produtos da RT-PCR em tubo único para o gene G e F. Amostras clínicas	84
Figura 17. Eletroforese dos produtos da RT semi <i>Nested</i> PCR e RT PCR para o gene G e F	85
Figura 18. Eletroforese dos produtos da RT semi <i>Nested</i> PCR para o gene G e F. Amostras clínicas	85
Figura 19. Eletroforese dos produtos da RT-PCR em tubo único para o gene F e G do HRSV-A. Diluição seriada em múltiplos de 10.....	88
Figura 20. Eletroforese dos produtos da RT-PCR em tubo único para o gene G e F do HRSV-B. Diluição seriada em múltiplos de 10	88
Figura 21. Eletroforese dos produtos da RT semi <i>Nested</i> PCR para o gene G e F do HRSV-A. Diluição seriada em múltiplos de 10	88
Figura 22. Eletroforese dos produtos da RT semi <i>Nested</i> PCR para o gene G e F do HRSV-B. Diluição seriada em múltiplos de 10	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos <i>primers</i> utilizados para RT semi <i>Nested</i> PCR e RT-PCR em tubo único, posição no genoma	69
Tabela 2 – Tabulação dos dados referentes à determinação da dose infectante em cultura de tecidos 50	75
Tabela 3 – Esquema de tabulação dos resultados para comparação entre as técnicas quanto à sensibilidade, especificidade e concordância.....	77
Tabela 4 – Número de amostras testadas e número de amostras positivas para o HRSV	80
Tabela 5 – Determinação da dose infectante em cultura de tecidos 50 (DICT ₅₀) HRSV-A	86
Tabela 6 – Determinação da dose infectante em cultura de tecidos 50 (DICT ₅₀) HRSV-B	87
Tabela 7 – Número de amostras positivas para o HRSV diagnosticados por diferentes técnicas.....	90
Tabela 8 – Comparação entre IFI e RT-PCR em tubo único para o diagnóstico do HRSV	91
Tabela 9 – Comparação entre IFI e RT semi <i>Nested</i> PCR para o diagnóstico do HRSV	91
Tabela 10 – Comparação entre RT-PCR em tubo único e RT semi <i>Nested</i> PCR para o diagnóstico do HRSV	91
Tabela 11 – Resultados da comparação da sensibilidade, especificidade E eficiências entre as técnicas	92
Tabela 12 – Comparação entre as técnicas analisadas quanto ao grau de concordância utilizando o método estatístico de kappa.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALTRs	Infecção aguda do trato respiratório (do inglês: <i>Acute lower respiratory tract infection</i>)
CCA	Agente de Coriza de chimpanzé (do inglês: <i>Chimpanzee coryza agent</i>)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro de controle e prevenção de doenças)
cDNA	DNA complementar
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatos (do inglês: <i>deoxynucleoside triphosphates</i>)
DRA	Doença respiratória aguda
ECP	Efeito citopático
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração para alimentos e fármacos)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês: <i>Fluorecein isothiocyanate</i>)
HCl	Ácido clorídrico
HeLa-I	Linhagem celular derivada de adenocarcinoma cervical humano e com maior expressão de ICAM-I
HEp-2	Linhagem celular derivada de carcinoma de laringe humana
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humano (do inglês: <i>human immunodeficiency virus</i>)
HRSV	Vírus respiratório sincicial humano (do inglês: <i>Respiratory Syncytial Virus</i>)
HU	Hospital Universitário

ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IFA	Ensaio de Imunofluorescência Indireta (do inglês: <i>Indirect immunofluorescence assay</i>)
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFImc	Imunofluorescência de material clínico
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
KDa	Kilodalton (10^3 daltons)
M	Molar
Mab	Anticorpo monoclonal
MEM	Meio Mínimo de Manutenção (do Inglês: <i>Minimum essential medium</i>)
mL	Mililitro (10^{-3} Litro)
mM	Milimolar (10^{-3} Molar)
Nas	Aspirado de nasofaringe (do inglês: <i>nasopharyngeal aspirates</i>)
NCI-H292	Linhagem celular derivada de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano
pb	Pares de bases
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos (do ingl: phosphate buffered solution)
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
pMoles	Picomoles (10^{-12} moles)
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico (do Inglês: <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuclease
RT	Transcriptase reversa (do inglês: <i>reverse transcriptase</i>)

RT-PCR	Reação em cadeia pela polimerase após transcrição reversa
SFB	Soro fetal bovino
-ssRNA	Ácido ribonucléico com polaridade negativa
TBE	Tampão Tris-borato-EDTA
DICT 50	Dose Infectante em cultura de tecidos 50
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
WRAIR	<i>Walter Reed Army Institute of Research</i> (Instituto de pesquisa Walter Reed Army)
x	Vezez
μL	Microlitro (10^{-6} litro)
g	Gravidade
%	Porcentagem
°C	Graus Celcius
K	Índice de Kappa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 ASPECTOS CLÍNICOS	24
1.2 CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS	27
1.2.1 Classificação	27
1.2.2 Estrutura do Vírus	28
1.2.3 Organização Genômica	37
1.2.4 Replicação Viral	39
1.2.5 Caracterização Antigênica	43
1.3 EPIDEMIOLOGIA	44
1.4 PREVENÇÃO E TRATAMENTO	49
1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 CASUÍSTICA	61
2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA	61
2.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS	62
2.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS	62
2.5 FLUXOGRAMA DE TRABALHO	63
2.6 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	64
2.6.1 Preparo das Lâminas	64
2.6.2 Triagem das amostras por IFI e Identificação do vírus	64
2.6.2.1 Triagem	65
2.6.2.2 Identificação	65
2.7 DETECÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO VIRAL	66
2.7.1 Amostras virais padrão	66

2.7.1.1 Linhagem celular	66
2.7.1.2 Inoculação em cultura de células	67
2.7.2 Extração do RNA Total	67
2.7.3 Primers.	68
2.7.4 RT-PCR em tubo único	70
2.7.4.1 Otimização da técnica RT-PCR em tubo único	70
2.7.5 RT semi <i>Nested</i> PCR.....	71
2.7.5.1 Obtenção do cDNA	71
2.7.5.2 Semi <i>Nested</i> PCR	71
2.8 Análise dos produtos amplificados	72
2.9 Sensibilidade analítica dos testes	73
2.9.1 Determinação da dose infectante em cultura de tecidos 50	73
2.9.1.1 Preparo das placas	73
2.9.1.2 Amostras virais padrão.....	73
2.9.1.3 Determinação da Dose Infectante em cultura de tecidos 50%	74
2.9.1.4 Cálculo da DICT ₅₀	75
2.9.2 Limiar de sensibilidade das técnicas	76
2.10 Tabulação e análise dos resultados	76
2.10.1 Sensibilidade e Especificidade.....	77
2.10.2 Método estatístico de Kappa (k)	78
3 RESULTADOS	80
3.1 AMOSTRAS CLÍNICAS.....	80
3.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)	81
3.3 RT-PCR EM TUBO ÚNICO.....	82
3.4 RT SEMI <i>NESTED</i> PCR.....	84
3.5 SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS.....	86

3.5.1 Determinação da dose infectante em cultura de tecidos (DICT 50).....	86
3.5.2 Limiar de detecção da RT PCRT em tubo único e RT semi <i>Nested</i> PCR ...	87
3.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS PELA RT-PCR EM TUBO ÚNICO, RT SEMI <i>NESTED</i> PCR E IFI.....	89
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	90
4 DISCUSSÃO	94
5 CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXO 1 Termo de consentimento pós-informado.....	129
ANEXO 2 Titulação das amostras virais padrão na cultura de células	131
ANEXO 3 Tabela de preços.....	132
ANEXO 4 Resultado das amostras colhidas no HU-USP e testadas nas diferentes técnicas de diagnóstico do HRSV - ano de 2005	134

1 INTRODUÇÃO

O vírus respiratório sincicial foi isolado pela primeira vez em 1955, durante uma epizotia ocorrida na *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR) em Washington DC, nos Estados Unidos, quando um grupo de chimpanzés apresentou sintomatologia de doença respiratória semelhante a um resfriado comum: coriza, tosse, espirros e secreção nasal mucopurulenta. Morris e colaboradores (1956), isolaram o agente que causava a doença e deram o nome de “*chimpanzee coryza agent*” (CCA).

O vírus foi isolado, inicialmente, em cultura de células hepáticas, a partir de swab de garganta de um dos animais e posteriormente foi verificado que sendo que 100% da colônia havia sido contaminada. A inoculação em diversos animais de laboratório: camundongos, hamsters, coelhos, cobaias, ratos e chimpanzés, mostrou que os últimos foram os únicos a desenvolver sintomatologia específica (CHANOCK *et al.*, 1957a). Um dos tratadores dos animais manifestou os mesmos sintomas, porém com gravidade menor. Embora a tentativa de isolamento do vírus fosse infrutífera, verificou-se um aumento do título de anticorpos fixadores de complemento contra CCA (OGRA, 2004). Aventou-se a hipótese que o CCA poderia ser de origem humana, sendo possível que a colônia de chimpanzés tenha se infectado após o contato com o homem (BELSHE *et al.*, 1991).

A ocorrência de anticorpos contra CCA em humanos foi verificado pelo teste de fixação de complemento. Verificou-se que adolescentes e adultos jovens possuíam anticorpos contra CCA, sugerindo infecção prévia com o novo agente. Em 1956, o Vírus respiratório sincicial (RSV), foi isolado pela primeira vez, de duas crianças, uma com pneumonia e outra com crupe (difteria laríngea) em Baltimore

(CHANOCK *et al.*, 1957a e 1957b). Estudos sorológicos realizados na época, mostraram que a maioria das crianças em Baltimore tinham sido infectadas com RSV antes dos quatro anos de idade. Investigações similares, em várias partes do mundo, indicaram que o HRSV estava associado com doenças do trato respiratório inferior, como pneumonia e bronquiolite (COLLINS *et al.*, 2001).

A denominação 'Vírus Respiratório Sincicial', deriva de sua característica de formar sincícios resultantes da fusão de células infectadas, formando uma célula multinucleada (COLLINS *et al.*, 2001). Posteriormente, foi verificado que este vírus era o principal agente causador de doenças agudas do trato respiratório inferior durante a infância, sendo responsável por um elevado índice de hospitalizações de crianças até 5 anos de idade com alto custo para os sistemas de saúde (VIEGAS *et al.*, 2005; GELZEN *et al.*, 1986). Atualmente o vírus respiratório sincicial humano (HRSV) também é descrito como importante patógeno em idosos e pacientes imunocomprometidos, com elevado índice de mortalidade em pacientes transplantados (ISON *et al.*, 2002; COLLINS, *et al.*, 2001).

Durante o primeiro ano de vida, cerca de 70% das crianças sofrem a infecção pelo HRSV e por volta dos 3 anos, 100% já terá contraído o vírus (OGRA, 2004; TRISTAM e WELLIVER, 1995; GIRARD *et al.*, 2005) e o pico de incidência ocorre entre 2 e 7 meses de vida (ANDERSON *et al.*, 1990). Apesar das re-infecções serem comuns durante toda a vida, inclusive numa mesma epidemia (SCOTT *et al.*, 2006), a primeira infecção por HRSV, geralmente é mais grave, as re-infecções em crianças mais velhas são brandas e em adultos a doença raramente é grave ou fatal (OGRA, 2004; HALL *et al.*, 1991). Resfriados causados por HRSV são mais prolongados e graves do que os causados por outros vírus (RUUSKANEN *et al.*, 1993; HALL *et al.*, 2001). No Brasil, o primeiro artigo relatando o isolamento do HRSV foi publicado em

1967, por Candeias e colaboradores.

1.1 Aspectos clínicos

A transmissão pode ocorrer por contato com secreções, via aerossol e, mais freqüentemente, por mãos e objetos contaminados, sendo muito infeccioso quando aplicado diretamente nas mucosas do olho ou nariz. O HRSV pode permanecer viável por 6 horas em diferentes superfícies (TRISTAM e WELLIVER, 1995).

O HRSV é um importante agente de infecções nosocomiais. Os funcionários de hospitais podem contribuir na disseminação do vírus, pela presença de secreções contaminadas nas mãos, roupas ou outros objetos (HALL *et al.*, 1975). A propagação do vírus é favorecida em ambientes fechados, como creches ou escolas. Crianças lactentes infectadas com HRSV constituem o maior reservatório do vírus, pois excretam grande quantidade de partículas virais facilitando a contaminação de indivíduos próximos.

O HRSV replica-se nas células do trato respiratório, causando um processo inflamatório que inclui destruição do epitélio, edema e aumento de produção de muco na região. O período médio de incubação do vírus é de 3-5 dias, quando ocorrem às primeiras manifestações clínicas típicas de um resfriado comum, com secreção nasal clara, tosse moderada, febre baixa e algumas vezes “chiado” evoluindo, geralmente, para a recuperação no período de aproximadamente uma semana. Alguns casos, entretanto, que incluem pacientes de risco, como crianças prematuras, com displasia broncopulmonar, doença cardíaca congênita, imunodeficiência congênita ou adquirida, transplantados e com fibrose cística, as manifestações clínicas podem evoluir para um quadro mais grave, com sintomas de pneumonia e bronquiolite, requerendo hospitalização (RUUSKANEN *et al.*, 1993;

HALL *et al.*, 2001; OGRA, *et al.*, 2004).

Estudos mostraram que 75% dos pacientes que apresentaram bronquiolite pelo HRSV no primeiro ano de vida, exibiam chiado ou problemas de funções pulmonares nos anos posteriores à infecção e, que esses sintomas clínicos diminuem gradualmente ao longo dos 10 anos seguintes. Stein e colaboradores (1999) examinaram 1000 crianças desde a infância até o início da adolescência, verificando que pacientes que apresentavam doenças brandas do trato respiratório causadas pelo HRSV nos primeiros 3 anos de vida, apresentaram aumento de “chiado” até os 6 anos de idade. Contudo, o risco de asma subsequente diminuiu progressivamente até os 13 anos, por outro lado em um grupo de crianças que apresentou infecção grave pelo HRSV no primeiro ano de vida houve um aumento na frequência da obstrução nos brônquios e asma até os 7 anos de idade, quando comparado com crianças não afetadas por bronquiolites graves (SIGURS, *et al.*, 2000). Em continuação ao estudo, estes mesmos autores confirmaram que o risco de desenvolvimento de asma alérgica e redução das funções pulmonares nestes pacientes podem persistir até os 13 anos (SIGURS *et al.*, 2005). As infecções por HRSV associadas à predisposição alérgica, podem comprometer os pulmões e contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias, como a asma (BECNEL *et al.*, 2005).

A imunidade adquirida após a primeira infecção por HRSV não é suficiente para prevenir uma infecção subsequente (HENDERSON *et al.*, 1979) e re-infecções pelos vírus podem ocorrer ao longo da vida (SULLENDER *et al.*, 1998), mas geralmente com um quadro mais branda da doença. A imunidade naturalmente adquirida para o HRSV não é completa, nem extensa e infecções recorrentes são freqüentes. Estudo realizado em Houston, Texas, demonstrou que 83% de crianças

infectadas durante o primeiro ano de vida foram re-infectadas no segundo ano e 46% foram re-infectadas durante o terceiro ano (GLEZEN *et al.*, 1986).

A alta variabilidade genética do HRSV pode ser uma das causas das re-infecções. White e colaboradores (2005) sugeriram que a infecção por um determinado grupo ou genótipo influencia a dinâmica de transmissão de variantes homólogas ou heterólogas.

Arbiza e colaboradores (2005) analisaram a variação genética da proteína G de HRSV isolados de crianças imunossuprimidas em episódios consecutivos de doenças respiratórias e compararam com isolados de HRSV que circulavam na população em geral. Os resultados mostraram que não houve modificações nas seqüências de aminoácidos (a.a.) desses isolados, sugerindo a possibilidade de infecção clínica persistente ou crônica pelo HRSV em crianças imunodeficientes devido, provavelmente, a uma resposta imunológica insuficiente.

O HRSV é um vírus bastante lábil e sensível a extremos de temperatura e pH, bem como a detergentes (AUSAR *et al.*, 2005). A 55°C é rapidamente destruído. Após um período de 24 horas a 37°C pode ocorrer redução de até 90% da sua infectividade e a 4°C por, uma semana, a infectividade diminui para 1%. Os ciclos de congelamento e descongelamento destroem o vírus. O congelamento rápido em gelo seco com álcool preserva a infectividade, particularmente se sacarose ou glicerina são adicionadas ao meio de congelamento e se o estoque for feito a baixas temperaturas (-70°C) (TRISTAM e WELLIVER, 1995).

1.2 Características do Vírus

1.2.1 Classificação

O HRSV é membro da ordem *Mononegavirales*, vírus de RNA de fita simples e polaridade negativa (Mono, do grego *Monos* “único, simples”, Nega “de RNA polaridade negativa, Virales, do latim *Virale* “vírus”). Pertence à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* e gênero *Pneumovirus*. Os gêneros da família *Paramyxoviridae* são diferenciados pelo diâmetro, número de genes e glicoproteínas de superfície. A partícula viral do HRSV não apresenta hemaglutinina e nem neuraminidase.

Dentro do gênero *Pneumovirus* existem além do HRSV, o RSV bovino (bRSV) e o Vírus da Pneumonia do camundongo (Murine Pneumonia Vírus). Foram descritas também amostras de bRSV em caprinos e ovinos, não consideradas como espécies diferentes, mas, representantes, juntamente com o bRSV, de um subgrupo de amostras de ruminantes. (van REGENMORTEL *et al.*, 2000). Figura 1.

Figura 1: Classificação dos Membros da Família *Paramyxoviridae* (COLLINS *et al.*, 2001).

1.2.2 Estrutura do vírus

O vírion é composto de nucleocápside de simetria helicoidal envelopado. O vírus é pleomórfico com diâmetro variando de 150 a 300 nm. O envelope viral tem origem na membrana citoplasmática da célula hospedeira, sendo, portanto, de constituição lipoprotéica. Sua superfície possui glicoproteínas de origem viral, que formam projeções de 11-20 nm, separadas por intervalos de 6-10 nm, que estão envolvidas no processo de aderência e penetração do vírus. O genoma viral é composto de RNA de fita simples não segmentado de polaridade negativa (-ssRNA), com peso molecular aproximado de 5×10^3 KDa (HUANG e WERTZ, 1982), contendo 15.222 nucleotídeos (Figura 2 e 3).

Figura 2: MODELO Representativo do Vírus Respiratório Sincicial Humano (“*The Big Picture Book of Viruses*”) acessado em 05/01/2006 e disponível em http://www.tulane.edu/~dmsander/Big_Virology/BVHomePage.html

Figura 3: Fotomicrografia do Vírus Respiratório Sincicial Humano. (acessado em 05/01/2005 e disponível em <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>)

Cada partícula infecciosa contém apenas uma cópia funcional do genoma (COLLINS *et al.*, 2001). Nas células infectadas pelo HRSV foram identificadas 11 proteínas. Destas, duas são proteínas não estruturais, NS1 (1C) e NS2 (1B), presentes em abundância nas células infectadas, mas em pequenas quantidades nos vírions. As demais são estruturais, sendo M e M2 as proteínas de matriz, N

(nucleoproteína), P (fosfoproteína) L (*Large* – polimerase) e M2-2 as proteínas da nucleocápside viral e três são glicoproteínas de superfície – G (adesão), F (fusão) e SH (*small hydrophobic*) (COLLINS *et al.*, 2001). As proteínas F e G são importantes imunógenos durante a infecção viral. A proteína F é relativamente conservada, ao contrário do observado com a proteína G (TRISTAM e WELLIVER, 1995). Figura 4.

Figura 4: Esquema do Genoma do HRSV (acessado em 05/01/2006 e disponível em <http://www.uq.edu.au/vdu/VDUHumanRespiratorySyncytialVirus.htm>

As proteínas NS1 (Peso molecular 15,5 KDa) e NS2 (Peso molecular 14,6 KDa), possuem 139 e 124 aminoácidos respectivamente. Suas funções não estão totalmente esclarecidas, podendo pelo fato de serem não estruturais, estar relacionadas à regulação da síntese do RNA, à morfogênese do vírion ou a interação com as células hospedeiras (COLLINS *et al.*, 2001). Essas proteínas só estão presentes em células infectadas e não nos vírions (RUUSKANEN *et al.*, 1993). Estudos “*in vitro*” demonstram que a proteína NS1 tem um forte poder inibidor da transcrição e replicação do RNA. Mas ainda não está estabelecido o quanto essa função de regulação negativa da proteína NS1 está presente na infecção natural pelo HRSV (ATREYA *et al.*, 1998).

As proteínas P, L e N estão associadas ao nucleocapsídeo e ao RNA genômico, formando o complexo ribonucleoproteína, considerado como a unidade

mínima para a transcrição e replicação do vírus. A proteína P é altamente fosforilada, ácida e tem um papel chave na regulação do processo de transcrição e replicação. Possui 241 aminoácidos, peso molecular de 35 KDa e o gene que a codifica possui 914 nucleotídeos (COLLINS *et al.*, 2001). A nucleoproteína N possui 391 aminoácidos, peso molecular de 43,4 KDa, sendo que o gene que a codifica possui 1203 nucleotídeos. É a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo, estando, estritamente associada ao RNA genômico (COLLINS *et al.*, 2001). A proteína L, constituída de 2165 aminoácidos e com peso molecular de 250 KDa é a maior proteína viral. O gene que a codifica possui 6578 nucleotídeos (COLLINS *et al.*, 2001). Parece ser a enzima RNA polimerase RNA dependente (TRISTAM e WELLIVER, 1996).

As proteínas M (Peso molecular 27 KDa) e M2-1 (peso molecular 22 KDa) possuem 256 e 194 aminoácidos respectivamente, são internas e não glicosiladas, e o gene que as codificam possuem 958 e 961 nucleotídeos. As funções da proteína M são mediar a associação do nucleocapsídeo com o envelope nascente (COLLINS *et al.*, 2001), inibir a transcrição celular no início das infecções e subsequente interagir com o nucleocapsídeo para inibir a transcrição viral (GHILDYAL, *et al.* 2002; FENG, *et al.*, 1987). A proteína M2-1 interage com a proteína P e N, atua como um fator no processo de transcrição prevenindo o término prematuro durante esse processo (COLLINS *et al.*, 2001; FEARNs e COLLINS, 1999, CARTEE *et al.*, 2001; CUESTA *et al.*, 2000), e favorece a passagem da polimerase viral pela região intergênica permitindo seu acesso à unidade final de transcrição (HARDY *et al.*, 1999; HARDY *et al.*, 1998). A função da M2-1 é essencial para a replicação do HRSV e alterações nesta sequência diminuem a infectividade do vírus (TANG *et al.*, 2001).

A proteína M2-2 está envolvida na regulação da transcrição e replicação do RNA viral (ATREYA *et al.*, 1998; SCHIMIDT *et al.*, 2001). Cheng e colaboradores (2005) observaram que uma alta expressão da M2-2 inibe a replicação viral, mas o mecanismo ainda não foi elucidado.

A proteína SH é uma molécula pequena de 64 aminoácidos de peso molecular 7,5 KDa, que se insere na membrana citoplasmática da célula hospedeira através de uma seqüência hidrofóbica que vai do aminoácido 14 ao 41. Sua porção carboxila-terminal é externa a membrana citoplasmática. Possui sítios para adição potencial de carboidratos tanto na região amino como na carboxila-terminal. Nas células infectadas pode estar presente de quatro formas diferentes dependendo do grau de glicosilação, conhecidas como SHo, SHg, SHp e SHt. A função da proteína SH durante a replicação ainda não está esclarecida, mas supõe-se estar envolvida na adsorção, penetração e desnudamento do vírus (COLLINS *et al.*, 2001; TECHAARPORNKUL, *et al.*, 2001; FELDMAN *et al.*, 2001; RIXON *et al.*, 2004). Os vírus recombinantes com deleção do gene SH, apresentam crescimento normal em cultura de células, inclusive com formação de sincícios (KARRON *et al.*, 1997; BUKREYEV, *et al.*, 1997). É possível que a função da SH seja modificar alguma propriedade do Complexo de Golgi da célula hospedeira para facilitar o transporte das proteínas virais pela via de secreção, uma vez que há acúmulo dessas proteínas na membrana desta organela (RIXON *et al.*, 2004).

A glicoproteína F é uma proteína do tipo I, ou seja, está ancorada na membrana próxima à região carboxila-terminal (intracitoplasmática) e contém uma seqüência sinal de clivagem próxima à região amino terminal (localizada na parte externa da membrana citoplasmática). Possui 574 aminoácidos, peso molecular de 70 KDa e o gene que a codifica possui 1903 nucleotídeos. Identificada como

proteína de fusão, é a responsável pela ligação do envelope viral com a membrana citoplasmática da célula hospedeira, liberando o nucleocapsídeo diretamente dentro do citoplasma. Proporciona também a fusão da célula infectada com uma adjacente, favorecendo a formação de sincícios (COLLINS *et al.*, 2001).

A proteína F é sintetizada como um precursor inativo denominado F0 que consiste em dois domínios denominados F2 (aminoácidos 1-130) e F1 (aminoácidos 137-154) e de um peptídeo clivável (aminoácidos 131-136) (BOLT *et al.*, 2000; SUGRUE *et al.*, 2001; RIXON *et al.*, 2002). Após a síntese e a glicosilação, a proteína F0 é clivada proteoliticamente por uma protease celular, semelhante à tripsina, em duas subunidades, F2 (peso molecular 20 KDa) e F1 (peso molecular 68 KDa), que permanecem ligadas por pontes dissulfeto (MATTHEWS *et al.*, 2000). Para *Pneumovirus* e *Paramyxovirus*, em geral, os primeiros 19 a 26 aminoácidos da porção amino terminal da subunidade F1 são hidrofóbicos e estão diretamente envolvidos com a inserção na membrana (COLLINS *et al.*, 2001; TRISTAM e WELLIVER, 1996). A subunidade F1 é relativamente bem conservada, sendo sua função comprometida mediante deleções ou substituições de aminoácidos (COLLINS *et al.*, 2001). A representação esquemática do precursor F0 pode ser visualizada na figura 5.

Figura 5: Representação esquemática da glicoproteína F. Os dois domínios F1 e F2 são formados após a clivagem proteolítica do precursor F0. A região transmembrana (TM), o sinal de clivagem (SC) localizado entre os aminoácidos 131-136 de F0 e o sítio de fusão (PF) hidrofóbico e rico em glicina, estão assinalados. Extraído de COLLINS *et al.*, 2001.

A glicoproteína G é uma proteína do tipo II, ou seja, está ancorada à membrana próxima à sua porção amino-terminal por um domínio hidrofóbico, não clivável, tipo sinal âncora, que se estende do resíduo 38 ao 66 (LICHENSTEIN *et al.*, 1996). Possui de 289 a 319 aminoácidos, dependendo da amostra viral, o gene que a codifica possui, em geral 918 nucleotídeos (grupo A) e varia de 920 a 980 nucleotídeos para o grupo B (JOHNSON *et al.*, 1987; MARTINEZ *et al.*, 1999; TRENTO, *et al.* 2003; ZLATEVA, *et al.* 2004). A glicoproteína G é sintetizada como uma proteína de peso molecular de 33 KDa, sendo posteriormente glicosilada para a obtenção da sua forma madura de peso molecular de 90 KDa. O ectodomínio carboxila-terminal da proteína G caracteriza-se por conter um alto teor de serina e treonina, cerca de 30% que são potenciais sítios de ligação de glicídios por ligações

glicosiladas do tipo “O”, ou seja, a ligação de glicídios a átomos de oxigênio das cadeias destes aminoácidos. A glicosilação da proteína também se faz por ligação glicosídica tipo “N”, ou seja, a ligação de glicídios ao átomo de nitrogênio da cadeia lateral da asparagina. O ectodomínio externo contém, portanto, de 3 a 8 sítios para adição de oligonucleotídeos por ligação glicosídica tipo “N” e mais de 70 sítios potenciais para adição de oligossacarídeos por ligação glicosídica tipo “O”, embora estime-se que a proteína madura possua de 24 a 25 cadeias de glicídios O-ligados (WERTZ *et al.*, 1985; JOHNSON, *et al.*, 1987). Possui também um alto teor de resíduos de prolina (cerca de 10%) o que contribui para a redução das estruturas secundárias da proteína (COLLINS *et al.*, 2001). Devido a sua constituição, foi sugerido que a glicoproteína G do HRSV seria homóloga às mucinas secretadas pelas células epiteliais (JOHNSON, *et al.*, 1987).

Levine e colaboradores (1987) verificaram que anticorpos contra a proteína G, inibiam a ligação dos vírus às células, demonstrando sua participação no processo de adsorção do vírus à célula hospedeira. Sabe-se que a glicoproteína G é uma proteína análoga a hemaglutinina de outros vírus da família *Paramyxoviridae*, porém não possui ação hemaglutinante (TRISTAM e WELLIVER, 1996).

A glicoproteína G é uma proteína de especial interesse por possuir a maior variabilidade entre os isolados virais (ANDERSON *et al.*, 1985; MUFSON *et al.*, 1985; GIMENEZ *et al.*, 1986; JOHNSON *et al.*, 1987). Pode suportar inserções e deleções ou múltiplas substituições de aminoácidos sem a perda de sua função (BEELER e COELING, 1989; TRENTO *et al.*, 2003; SATO, *et al.* 2004; SCOTT *et al.*, 2004 e ZLATEVA *et al.*, 2004; NAGAI *et al.*, 2004). A variabilidade da proteína G está concentrada no domínio extracelular, no qual se encontram duas regiões variáveis, que contém alto teor de serina e tronina, entre os aminoácidos 69-164 e

207-298, com aproximadamente 56% de divergência entre as amostras A e B (JOHNSON *et al.*, 1987). Intercalando essa região de alta variabilidade, existe uma região mais conservada com um pequeno segmento de 13 aminoácidos (164-176) e quatro resíduos de cisteína (C173, C176, C182, C186), conservados em todas as amostras de HRSV (SULLENDER, 2000), sugerindo ser este segmento o responsável pela ligação do vírus a um receptor celular. A representação esquemática da glicoproteína G pode ser visualizada na figura 6.

Figura 6: Representação esquemática da glicoproteína G. (A) Estrutura primária de aminoácidos da linhagem A2, sendo: Tm = domínio transmembrana; cito = domínio interno à membrana citoplasmática; CCCC = quatro resíduos de cisteína (C¹⁷³, C¹⁷⁶, C¹⁸² e C¹⁸⁶) conservados em todas as amostras. (B) Região de 13 aminoácidos estritamente conservada nas amostras de HRSV; (C) Representação das duas regiões variáveis da proteína G intra e intergrupos do HRSV, ricas em serina e treonina, compreendendo os aminoácidos 69-163 e 199-298 e região conservada compreendendo os aminoácidos 163-199. As regiões transmembrana e citoplasmática, compreendo os aminoácidos 1-69, são conservadas. Extraído de SULLENDER, 2000.

As glicoproteínas F e G são as mais importantes proteínas envolvidas na resposta imune (CANE, 2001), sendo que anticorpos, tanto policlonais como

monoclonais (MAbs) específicos contra elas, são capazes de neutralizar o vírus *in vitro* (ANDERSON *et al.*, 1988; HENDRY *et al.*, 1988). Estudos realizados em camundongos, pela transferência passiva de monoclonal anti-F, mostraram haver redução da replicação de vírus nos pulmões (TAYLOR, *et al.*, 1984).

1.2.3 Organização genômica

O genoma viral é composto de RNA de fita simples não segmentado de polaridade negativa (-ssRNA) com peso molecular aproximado de 5×10^3 kDa (HUANG e WERTZ, 1982) e contendo 15.222 nucleotídeos (COLLINS *et al.*, 2001). A figura 7 mostra o esquema do mapa genético do RNA genômico do HRSV, feito com base na linhagem A2.

Figura 7: Mapa genético do RNA genômico do HRSV (Linhagem A2). Os genes são identificados de acordo com a proteína que codificam (listadas ao longo da parte superior do mapa). Os números abaixo dos nomes de cada proteína correspondem ao tamanho, em nucleotídeos das seqüências apontadas. As duas caixas de texto mostram, em detalhes, as regiões de junções entre os genes (regiões intergênicas) e a região de sobreposição entre os genes M2 e L (*overlap*). Extraído de COLLINS *et al.*, 2001.

A porção 3' do RNA genômico consiste de uma região *leader* extragênica de 44 nucleotídeos. A região *leader* é seguida por dez genes virais na seguinte ordem: 3' –NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'. O gene L é seguido de uma região *trailer* extragênica de 155 nucleotídeos. Cada gene começa com um sinal conservado de início do gene (*gene-start signal*) composto por nove nucleotídeos cuja seqüência é 3' –CCCCGUUUUA (exceto para o gene L que apresenta as seguintes diferenças sublinhadas: 3' –CCCUGUUUUA). Cada gene termina com um sinal semiconservado de término do gene (*gene-end signal*) composto por doze a treze nucleotídeos cuja seqüência é 3' –UCA^A_UUN^{AAA}_{UUU}UUU- que direciona a terminação

transcricional e a poliadenilação (COLLINS *et al.*, 2001).

Os primeiros nove genes não apresentam sobreposições e são separados por regiões intergênicas que, para a linhagem A2, variam de 1 a 52 nucleotídeos. Os dois últimos genes, M2 e L, apresentam uma sobreposição de 68 nucleotídeos. Sendo assim, o sinal de início do gene L está localizado dentro do gene M2 bem como o sinal de término e poliadenilação do gene M2 está localizado dentro do gene L (COLLINS *et al.*, 2001).

1.2.4 Replicação Viral

A adsorção do vírus a receptores presentes na superfície da célula hospedeira é mediada pela glicoproteína G. Um glicosaminoglicano semelhante à heparina, composto de uma sequência alternada de ácido hexurônio e glucosamina, ou um outro ainda não identificado seriam os receptores celulares (KRUSAT e STRECKERT, 1997; HALLAK *et al.*, 2000a). (KRUSAT e STRECKERT, 1997; HALLAK *et al.*, 2000a). Entretanto, ainda não se sabe se a interação é apenas um passo inicial para a posterior ligação do vírus a um receptor de alta afinidade ainda desconhecido (MARTINEZ e MELERO, 2000; HALLAK *et al.*, 2000b). Malhotra e colaboradores (2003) observaram em células HEp-2 um aumento da anexina II, após a infecção pelo HRSV, sugerindo o envolvimento desta na adsorção.

A liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular, este passo é mediado pela glicoproteína de fusão F, importante na fusão do envelope viral com a membrana celular, promovendo a liberação do nucleocapsídeo diretamente no

citoplasma da célula hospedeira. Todas as etapas do ciclo replicativo do HRSV ocorrem no citoplasma sem envolvimento do núcleo celular (Figura 8) (COLLINS *et al.*, 2001).

O processo de transcrição do genoma viral inicia após a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Os genes são transcritos na direção 3' - 5' a partir de um único promotor localizado na posição 3'. De acordo com o mecanismo proposto para o HRSV, a enzima RNA polimerase RNA dependente contacta a região *leader* do genoma iniciando a transcrição do primeiro nucleotídeo. Na junção entre a região *leader* e o primeiro gene, o pequeno transcrito é liberado e a polimerase recomeça a transcrição por um mecanismo seqüencial de início-fim, guiada pelos sinais de início do gene (*start-signal-gene*) e fim do gene (*end-signal-gene*). O resultado é a síntese de uma série de mRNAs subgenômicos. Os RNAs parecem ser cópias exatas dos genes, não havendo evidências de modificações como um *splicing*, por exemplo. Os RNAs transcritos recebem um *cap* na ponta 5' e são poliadenilados na ponta 3' (COLLINS *et al.*, 2001).

Figura 8: Esquema da estratégia de transcrição, tradução e replicação do genoma dos vírus da família *Paramyxoviridae*. Retirado de COLLINS *et al.*, 2001.

Além dos dez mRNAs produzidos pode-se encontrar, em menores quantidades, grandes mRNAs poliadenilados. Estes politranscritos são gerados pela transcrição contínua de dois ou mais genes e contém tanto a sequência dos genes quanto a da região intergênica. Aparentemente, em torno de 5% a 10% das vezes, a polimerase falha no reconhecimento do sinal de fim do gene e continua sintetizando o mRNA até encontrar o próximo sinal. O sinal de início do gene L localiza-se 68 nucleotídeos acima do sinal de fim do gene M2, não afetando, todavia, a síntese do mRNA do gene M2. Por outro lado, a presença do sinal de fim do gene M2 dentro do gene L resulta numa alta frequência (aproximadamente 90%) de terminação prematura da transcrição do gene L. O principal produto é um mRNA poliadenilado de 68 nucleotídeos, sendo o mRNA do gene L muito menos abundante. Possivelmente, assim como para os politranscritos, o mRNA completo do gene L é

gerado quando a polimerase falha em reconhecer o sinal de fim do gene M2 (COLLINS *et al.*, 2001).

A quantidade de cada mRNA diminui com a distância do gene ao promotor, possivelmente pelo desligamento da polimerase durante a transcrição seqüencial. Este mecanismo regulatório possibilita aos vírus fazer uso eficiente da maquinaria traducional da célula. Um nucleocapsídeo contém cerca de cem vezes mais proteína N, na sua estrutura, do que proteína L (KINGSBURY, 1990; COLLINS *et al.*, 2001).

Além da transcrição e tradução das proteínas, outro passo importante é a replicação do genoma que produz moldes adicionais do genoma para transcrição e replicação e fornece genomas em grande quantidade para serem incorporados nas novas partículas virais. A produção da fita complementar de RNA positivo (+ssRNA), que servirá de molde para gerar cópias do genoma viral (-ssRNA), requer que a maquinaria de produção de RNA entre num modo de “anti-terminação”, ignorando todos os sinais de início e fim presente entre os genes e entre a seqüência *leader* e o gene NS1 (KINGSBURY, 1990).

A maturação do vírus ocorre, num primeiro passo, com a montagem do nucleocapsídeo pela combinação da proteína N com o RNA genômico seguido da adição das proteínas P e L. A montagem do envelope se dá com as glicoproteínas virais, modificadas por glicosilação durante seu transporte através do retículo endoplasmático e Complexo de Golgi, ocupando o lugar das proteínas celulares na membrana plasmática. Em seguida, as proteínas da matriz se agregam na porção interna do envelope nascente. Finalmente, o nucleocapsídeo alcança a superfície e ocorre o brotamento do mesmo, levando consigo uma porção da membrana plasmática, num processo inverso ao da penetração por fusão (KINGSBURY, 1990).

Os antígenos virais podem ser detectados 9 horas após infecção em cultura de células e o vírus infeccioso entre 11 e 13 horas (OGRA, 2004; RUUSKANEN *et al.*, 1993).

1.2.5 Caracterização antigênica

Estudos iniciais sugeriam que havia somente um sorotipo de HRSV, porém, Coates e Chanock (1962) observaram diferenças antigênicas entre duas amostras. A cepa A1 não era neutralizada com soro hiperimune de coelhos produzido com a cepa Long. Estudos posteriores demonstraram haver também diferenças antigênicas entre as amostra Long e Kansas-87 e entre outros isolados (COATES *et al.*, 1963 e 1966). Entretanto, foi somente com a utilização de anticorpos monoclonais (MAbs) que essas diferenças se mostraram mais definidas, mas foram os trabalhos de Anderson e colaboradores (1985) e Mufson e colaboradores (1985) que estabeleceram definitivamente a divisão das amostras em dois grupos distintos, denominados A e B baseados na reatividade com um painel de MAbs.

Diversos trabalhos, relataram que a maior divergência entre os grupos A e B residia na glicoproteína G. As amostras A2 (tipo A) e CH18537 (Tipo B) apresentam, entre si, 33% de divergência na sequência de nucleotídeos do gene G e 47% na de aminoácidos (JOHNSON *et al.*, 1987; COLLINS *et al.*, 2001; MUFSON *et al.*, 1985; HENDRY *et al.*, 1988).

Estudos posteriores demonstraram haver variações antigênicas dentro de cada um dos grupos, possibilitando a divisão em subtipos característicos. Anderson

e colaboradores (1988), baseados na reatividade ou não das amostras com diferentes MAb's, estabeleceram um total de 10 subtipos que foram designados arbitrariamente de A1 a A7 e de B1 a B3. Hall e colaboradores (1990) descreveram o um subtipo B4 dentro do grupo B. Estudos recentes baseados na variabilidade genética da glicoproteína G classificaram o grupo A nos genótipos GA1 a GA7 (PERET *et al.*, 1998 e 2000) e SAA1 (VENTER *et al.*, 2001) e o grupo B nos genótipos GB1 a GB4 e SAB1 a SAB3 (VENTER *et al.*, 2001; GILCA *et al.*, 2006). Desde 1999 foi relatada em diversas localidades a circulação de um novo genótipo dentro do grupo B, que se caracterizava por possuir uma inserção de 60 nucleotídeos no gene G. (SCOTT *et al.*, 2004; TRENTO *et al.*, 2003; NAGAI *et al.*, 2004; SATO, *et al.* 2004; ZLATEVA *et al.*, 2004). Outras inserções menores (3 a 6 nucleotídeos) também foram descritas no Uruguai, Argentina e Japão (BLANC *et al.*, 2005; KAMASAKI *et al.*, 2000), demonstrando a alta variabilidade encontrada no gene G, nessa última década, em amostras pertencente ao grupo B.

1.3 Epidemiologia

O HRSV ocupa um papel de destaque dentre as doenças agudas do trato respiratório, principalmente em crianças, tanto nos países desenvolvidos com em desenvolvimento (SCOTT *et al.*, 2006), podendo ocorrer em todas as faixas etárias. Entretanto, crianças de 6 semanas a 9 meses são as que desenvolvem problemas mais sérios, tais como: pneumonia e bronquiolite (COLLINS *et al.*, 2001).

Nos EUA é estimado que o HRSV seja responsável por 18.000 a 75.000

hospitalizações e 90 a 1900 mortes por ano (GIRARD *et al.*, 2005).

O HRSV atualmente é reconhecido como um importante patógeno para a população idosa, principalmente aquela parcela da população que vive em instituições (FALSEY, 1998; HAN *et al.*, 1999; FALSEY e WALSH, 2000). Adultos com outras complicações, como doença obstrutiva pulmonar crônica, doença cardíaca e imunocomprometidos, estão predispostos a infecções mais graves pelo vírus (FALSEY e WALSH, 2000).

A mortalidade não é comum, sendo que as maiores taxas encontram-se entre as crianças com doenças associadas, tais como displasia broncopulmonar, hipertensão pulmonar, doença cardíaca congênita, imunocomprometidos e transplantados (McDONALD *et al.*, 1982; GROOTHUIS *et al.*, 1988). Os receptores de transplante de órgãos sólidos geralmente apresentam predisposição a infecções mais sérias do que os transplantados de medula óssea (HARRINGTON *et al.*, 1992). Estudos realizados na Índia e Tailândia mostram que o HRSV é a causa de 20-30% de infecções no trato respiratório em crianças de 1 a 4 anos de idade, proporção similar encontrada nos países desenvolvidos (GIRARD *et al.*, 2005).

No Brasil, estudos demonstram que as doenças respiratórias agudas (DRAs) perfazem 25-50% das consultas dos postos de saúde e cerca de 2/3 dos atendimentos de emergência em hospitais (SUTMOLLER *et al.*, 1995). No estudo realizado por Vieira e colaboradores (2001), na cidade de São Paulo, o HRSV foi o patógeno viral mais freqüentemente encontrado em crianças (41.8%) com DRA. Outros estudos relataram que, no Brasil, o HRSV foi responsável por 17% a 68% das infecções virais em crianças internadas (MOURA, *et al.*, 2003; CALEGARI, *et*

al., 2005; MOURA, *et al.*; 2006; D'ELIA, 2005; SERAFINO, *et al.*, 2004), demonstrando a importância desse patógeno no país.

O HRSV é importante causa de infecções nosocomiais (GOLDMANN *et al.*, 2001). O número de crianças infectadas internadas em um mesmo quarto, bem como a permanência no hospital favorece vírus (HALL *et al.*, 1975b). O índice de infecções hospitalares, durante o surto de HRSV, pode aumentar de 26% para 47% em berçários de recém nascidos e de 20% para 40% em unidades de crianças mais velhas (COLLINS *et al.*, 2001).

A epidemia do HRSV apresenta uma sazonalidade bem definida, ocorrendo anualmente no final do outono, inverno ou início da primavera, mas não durante o verão. Cada epidemia dura cerca de 5 meses, com 40% dos casos ocorrendo durante os meses de pico, geralmente no meio do surto (COLLINS *et al.*, 2001). Países com clima temperado, como Argentina e Paquistão, tem uma sazonalidade similar aos países norte americanos e europeus, já em países de clima tropical é relatado o aumento da incidência do HRSV nas épocas de chuva. Diferenças marcantes na sazonalidade do HRSV têm sido relatadas em regiões geograficamente próximas, como Moçambique e África do Sul, ou Bangladesh e Índia. A tendência cultural e o comportamento de uma comunidade podem influenciar na disseminação do HRSV (GIRARD *et al.*, 2005).

Em Turku, localizado na porção temperada da Finlândia, observou-se que os surtos obedecem a ciclos de dois anos, com picos distintos: um menor na primavera e um maior no inverno. O surto, que dura cerca de um ano e meio, começa em dezembro-janeiro do primeiro ano do ciclo e se estende até aproximadamente, março do segundo ano. Os casos positivos desaparecem por completo até que se

inicia um novo ciclo em dezembro-janeiro (WARIS, 1991).

No Brasil os surtos ocorrem, geralmente, nos meses de outono ao início da primavera (CINTRA, *et al.*, 2001, MIYAO, *et al.*, 1999; NASCIMENTO, *et al.*, 1991, VIEIRA, *et al.*, 2001, BOTOSSO, 2001). Recentes estudos mostram que a incidência do HRSV em diferentes localidades do Brasil, apresentam a mesma sazonalidade como em Fortaleza, Salvador e Uberlândia nos quais os surtos inciam em janeiro ou fevereiro e termina em julho ou agosto (MOURA, *et al.*, 2006; CALEGARI, *et al.*, 2005; SERAFINO, *et al.*, 2004).

Em São Paulo, o pico do surto do HRSV, ocorre no outono e não está associado com estações chuvosas, sendo entretanto, coincidente com a época em que são observados altos níveis de poluição na cidade. Entretanto, a associação entre a poluição ambiental e a incidência do HRSV não foi suficientemente estudada (HEIN, 1997).

O entendimento da epidemiologia local é importante para a implementação e o sucesso do desenvolvimento de um possível programa de vacinação (KARRON *et al.*, 2004; WEBER *et al.*, 1998).

As diferenças de patogenicidade entre os grupos A e B ainda não estão totalmente esclarecidas. Alguns autores concluíram que as infecções pelo grupo A resultam em doenças mais graves (TAYLOR *et al.*, 1989; MCCONNOCHIE *et al.*, 1990; HALL *et al.*, 1990; IMAZ *et al.*, 2000; GILCA *et al.*, 2006). Por outro lado, Zelaya e colaboradores (1994) e Hornsleth e colaboradores (1998) constataram maior gravidade em crianças infectadas pelo grupo B. Há ainda autores que não observaram em seus estudos diferenças significativas de patogenicidade entre os outros grupos (RUSSI *et al.*, 1989 a e b; BROUARD *et al.*, 1993; MCINTOSH *et al.*,

1993; STRALIOTTO *et al.*, 1994). Buckingham e colaboradores (2000), não relacionaram uma maior ou menor gravidade da doença com o tipo do vírus, mas com a quantidade de vírus presente na secreção. Parece haver maior incidência de doenças graves no trato respiratório inferior em crianças do sexo masculino (PARROT *et al.*, 1973; QUEIROZ *et al.*, 2002).

O padrão de circulação dos grupos A e B diverge de local para local e de ano para ano. Dados da literatura revelam que os dois tipos têm circulado conjuntamente em muitas epidemias em várias regiões do mundo, com prevalência do grupo A (ANDERSON *et al.*, 1991; VIEGAS *et al.*, 2005, FRABASILE *et al.*, 2003, SCOTT *et al.*, 2004 e ZLATEVA *et al.*, 2004; GILCA *et al.*, 2006, BOTOSSO, 2002), embora tenham sido descritos surtos com predominância do grupo B (HENDRY *et al.*, 1986; LUKIC-GRILIC *et al.*, 1998).

Há mais de dez anos, a variabilidade da proteína G do HRSV é investigada (MELERO, *et al.*, 1997; CHOI e LEE, 2000; SCOTT *et al.*, 2004; ZLATEVA, *et al.*, 2004, VIEGAS *et al.*, 2005; GALIANO, *et al.*, 2005), demonstrando a existência de vários genótipos co-circulando em um mesmo surto, com predominância de um ou dois genótipos, os quais podem continuar circulando por vários anos consecutivos, ou diminuir nos surtos subseqüentes, até o seu desaparecimento (CANE *et al.*, 1994, 1991; CANE; JOHANSEN *et al.*, 1997; COGGINS *et al.* 1998; LUKIC-GRILIC *et al.*, 1998; PERET *et al.*, 1998, 2000; CHRISTENSEN *et al.*, 1999; CHOI; LEE 2000; ZLATEVA *et al.*, 2004 e 2005).

Os genótipos tem distribuição mundial, e cepas isoladas em comunidades distintas podem ser mais relacionadas que as isoladas em um mesmo lugar, demonstrando um padrão mais temporal que geográfico de circulação (CANE *et al.*,

1992). Os genótipos que surgem no final de um surto, tendem a predominar no próximo (Sato *et al.*, 2004 e Zlateva *et al.*, 2005). As mudanças decorrentes das alterações no genótipo podem interferir na estrutura antigênica do vírus, conferindo uma vantagem evolucionária, o que permite re-infectar indivíduos expostos ao HRSV anteriormente.

Nos estudos realizados por Botosso (2001), sobre a diversidade genética da glicoproteína G do HRSV entre os anos de 1995-1998, confirmam a alternância na circulação de cepas de HRSV em São Paulo no decorrer dos anos, mas ainda é questão aberta se esse fenômeno é decorrente da imunidade desenvolvida pela população ou se está relacionado a características de um genótipo em particular ou, ainda, se é necessária à predominância de um determinado genótipo para a ocorrência de um novo surto.

1.4 Prevenção e Tratamento

A prevenção de infecções pelo HRSV por meio de uma vacina foi muito estudada contudo, sem sucesso até o momento. A primeira vacina produzida e testada em crianças e lactentes, era de vírus vivo atenuado com formalina. Porém, além de não proteger contra a doença, as crianças vacinadas sofreram doenças mais graves em exposição subsequente ao vírus, com cerca de 80% de hospitalizações e dois óbitos, quando comparadas com o grupo controle não vacinado. (DUDAS e KARRON, 1998). O aumento da gravidade da doença, foi demonstrado em modelos animais e é resultado de vários fatores: i - inadequada

produção de anticorpos neutralizantes no soro; ii - baixa imunidade local; iii - deposição do complexo imune; iv - indução da resposta exacerbada do tipo Th2, com eosinofilia pulmonar e aumento da produção de citocinas IL-4 e IL5 (DURBIN *et al.*, 2003; POLACK *et al.*, 2002).

O avanço nas técnicas de biologia molecular e da biotecnologia na última década possibilitou o teste de novos métodos para fabricação de vacinas como: atenuação do vírus gerada por passagens em cultura de células a baixas temperaturas juntamente com o uso de agentes mutagênicos (CROWE *et al.*, 1994; RANDOLPH *et al.*, 1994); vacinas contendo subunidades virais (BELSHE *et al.*, 1993; HOMA *et al.*, 1999; OIEN *et al.*, 1994) e vírus recombinantes que contêm os epítomos protetores do HRSV (BRANDT *et al.*, 1997; COLLINS *et al.*, 1990; CROWE *et al.*, 1994). Vacinas de subunidades utilizando proteína F purificada (PFP) ou proteína F em conjunto com G e M (Sanofir-Pasteur) ou ainda, o domínio central da proteína G, BBG2Na, foram desenvolvidas e submetidas a testes clínicos, sendo a PFP, a vacina com resultados mais promissores, apresentando-se segura e imunogênica em adultos, crianças acima de 12 meses com ou sem doença pulmonar, bem como em idosos e mulheres grávidas (FALSEY *et al.*, 1997; GROOTHUIS *et al.*, 1998; PIEDRA *et al.*, 1996). Os recém-nascidos de mães que receberam a vacina apresentaram título quatro vezes maior em comparação aqueles cujas mães receberam o placebo (PIEDRA *et al.*, 1998).

Vacinas atenuadas aplicadas na mucosa respiratória foram desenvolvidas por mais de uma década, sendo a mais estudada, a atenuada por termossensibilidade, e com crescimento adaptado ao frio. Porém, o uso dessas vacinas está comprometido pela possibilidade de reversão genética e da virulência, além da baixa imunogenicidade (WRIGHT *et al.*, 2000).

Outras vacinas utilizando a tecnologia do DNA recombinante foram avaliadas, em ensaios pré-clínicos e clínicos, sendo uma delas, a rA2cp248/404/1030? SH (MOYA *et al.*, 2000), a primeira suficientemente atenuada e tolerada por crianças de 6 a 24 meses, não estando associada com o desenvolvimento de doenças do trato respiratório e com limitada instabilidade fenotípica (SHIMIDT *et al.*, 2001; KARRON *et al.*, 2005; SCHIMIDT *et al.*, 2001).

A combinação de vacinas de vírus atenuado com as vacinas de subunidades também é uma opção considerada para proteção contra doenças causadas pelo HRSV, entretanto estudos preliminares, foram inconclusivos em crianças e idosos (GIRARD *et al.*, 2005).

Apesar de todos os esforços, nenhuma das vacinas tem previsão de licenciamento ou utilização (PIROFSKI *et al.*, 1998). As restrições ocorrem por receio às reações adversas, descritas após a primeira experiência de imunização (CROWE, 2002), à presença de anticorpos maternos e o sistema imune imaturo do público alvo da imunização (ENGLUND *et al.*, 1991).

Nas infecções do trato respiratório inferior, causadas pelo HRSV, o tratamento indicado consiste em remoção mecânica das secreções, posicionamento apropriado da criança, administração de oxigênio umidificado e nos casos mais graves a assistência respiratória (COLLINS *et al.*, 2001).

O antiviral Ribavirina (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), um nucleosídeo análogo a guanosina, constitui uma terapia indicada para o tratamento do HRSV, e está licenciada desde 1986. O seu uso é indicado na forma de aerossol (COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES, 1993) para tratamento de doenças graves causadas por HRSV. O mecanismo de ação de inibição do HRSV não é bem

conhecido, mas acredita-se que a Ribavirina atue reduzindo as concentrações de guanosina fosfato, necessárias para transcrição viral, através de competição, interferindo no início da polimerização e extensão do RNA, passos essenciais para a síntese de proteínas virais (ERIKSSON *et al.*, 1997; WRAY *et al.*, 1985 a, b). Ainda não foram encontrados HRSV mutantes resistentes ao nucleosídeo, mesmo após uso prolongado da droga (HAYDEN *et al.*, 1996), isso indica que, provavelmente outros sítios de replicação viral também possam ser afetados. Vários estudos com a ribavirina concluíram que esta era capaz de inibir a replicação do HRSV e aumentar a saturação de oxigênio em crianças com infecção do trato respiratório inferior, infecção pulmonar crônica, e em indivíduos imunocomprometidos, melhorando as condições clínicas. Entretanto, outros estudos afirmam que o uso da ribavirina tem efeitos mínimos ou insignificantes em pacientes com HRSV, na mortalidade e duração da hospitalização. Estes resultados conflitantes, aliados ao alto custo e tratamento prolongado (12 horas ou mais de inalação) fazem com que o uso da ribavirina tenha sua validade contestada (WYDE, 1998; BROUGHTON *et al.*, 2003; VENTRE *et al.*, 2004).

O período de incubação do vírus no trato respiratório superior é de 3 a 5 dias, após o qual pode infectar o trato respiratório inferior. Esse período possibilita uma intervenção terapêutica efetiva, pela utilização de moléculas inibidoras de fusão da proteína F com a célula hospedeira, administradas via oral, como o BMS-433771 (POLACK *et al.*, 2004; McKIMM-BRESCHKIN *et al.*, 2000; WYDE *et al.*, 1998 e 2003; CIANCI *et al.*, 2005). Este componente é ativo contra ambos os grupos do HRSV (A e B). Estudos *in vitro* demonstraram que o fármaco inibe diretamente a formação de sincícios, mesmo quando adicionado após o estabelecimento da infecção e não apresentou citotoxicidade em nenhuma das culturas de células

testadas, inclusive em hepatócitos humanos, além de mostrar eficiência quando testado em dois modelos de roedores, que receberam o BMS-433771 uma hora antes de serem inoculados com o HRSV. Não houve evidência de vírus resistentes em nenhum dos modelos estudados, sendo efetivo em camundongos imunossuprimidos infectados com HRSV, demonstrando que a resposta imune não contribui para a eficiência deste componente antiviral. (CIANCI *et al.*, 2005).

Diante da falta de uma vacina eficaz, a imunoprevenção passiva é feita com o uso de imunoglobulinas (Igs). As Igs devem ser administradas com grande cuidado para se evitar a exacerbação da doença, principalmente porque a população alvo é composta de crianças e bebês (GROOTHUIS *et al.*, 1994; OTTOLINI *et al.*, 1997). As Igs usadas inicialmente (GROOTHUIS *et al.*, 1991; MEISSNER *et al.*, 1993) apresentavam títulos de anticorpos variáveis, não sendo capazes de proteger contra a doença (HEMMING *et al.*, 1987). Outras Igs com títulos mais altos foram testadas, sendo capazes de abrandar o quadro clínico, porém, não foi observada proteção total contra infecção natural (GROOTHUIS *et al.*, 1995; PREVENT, 1997; SIMÕES *et al.*, 1996). O alto custo da Igs, o risco associado ao grande volume de globulina administrado e a necessidade de várias visitas ao hospital ou ambulatório limitam a sua utilização (OTTOLINI *et al.*, 1997). A primeira medida efetiva na prevenção da infecção do trato respiratório inferior e, conseqüentemente, a hospitalização de crianças, foi a administração mensal, via intravenosa, de imunoglobulinas confeccionadas a partir de plasma humano com altos títulos anti-HRSV, como o RSV-IGIV (Respigam[®]) (SASTRE *et al.*, 2004).

Para melhorar a potência dos anticorpos e substituir a administração intravenosa por intramuscular foi desenvolvido um anticorpo monoclonal anti-HRSV denominado MEDI-493 ou Palivizumab (SynagisTM), aprovado pelo FDA (*Food and*

Drug Administration) desde 1998, que se mostrou eficaz na redução de internações por HRSV em lactentes de alto risco. O Palivizumab é uma IgG de camundongo humanizada que atua ligando-se a glicoproteína F. A profilaxia mensal com Palivizumab foi associada, em geral, a uma redução de 55% nas hospitalizações por HRSV. Em lactentes com idade gestacional de 32 semanas, as reduções foram de 47% e em lactentes com idade gestacional entre 32 e 35 semanas, a redução chegou a 80% (THE IMPACT RSV STUDY GROUP, 1998). O tratamento com palivizumab reduz a replicação do HRSV e é associado com uma significativa redução na gravidade da doença. Estudos mostraram que crianças com até 12 meses de vida que receberam palivizumab durante uma primeira epidemia de HRSV tiveram um menor risco de desenvolver “chiado” na epidemia subsequente, quando comparadas à crianças que não receberam este monoclonal (SIMÕES *et al.*, 2004; COMMITTEE ON INFECTIONS DISEASES AND COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 1998; MEDIMMUNE Inc.; PEDIATRIC PHARMACOTHERAPY – UNIVERSITY OF VIRGINIA).

DeVicenzo e colaboradores (2004) analisaram vírus isolados de pacientes de oito centros dos EUA, não identificando nenhum vírus resistente ao palivizumab. Um desestimulante para o uso do Palivizumab é o alto custo financeiro associado ao trabalhoso programa de prevenção. Cada frasco contendo 100 mg do remédio custa em torno de U\$ 900, sendo que a dose recomendada é de 15 mg/Kg de peso corporal, administrada uma vez por mês durante a época de epidemia do HRSV. As ampolas, uma vez abertas e reconstituídas, devem ser utilizadas no prazo máximo de 6 horas (COMMITTEE ON INFECTIONS DISEASES AND COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 1998; MEDIMMUNE Inc.; PEDIATRIC PHARMACOTHERAPY – UNIVERSITY OF VIRGINIA).

Atualmente o estudos de monoclonais mais potentes, está em curso para determinação da segurança e eficácia (MEJÍAS *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005).

1.5 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico rápido e preciso do HRSV faz-se necessário para evitar o uso desnecessário de antibióticos e a utilização de terapia específica pela Ribavirina, além de permitir a execução das medidas necessárias para evitar infecções nosocomiais, nas quais o HRSV ocupa posição de destaque (TURNER, 1996; HITE e HUANG, 1996).

O diagnóstico laboratorial do HRSV pode ser direto, pela detecção de antígenos virais, do ácido nucléico e/ou do vírus infectante ou indireto, pela detecção de anticorpos específicos para o agente (WARIS, 1992). Em rotina, as secreções respiratórias são utilizadas como material biológico para o diagnóstico direto, sendo os melhores espécimes, os aspirados ou lavados de secreções de nasofaringe (MACKIE *et al.*, 1991; MASTERS *et al.*, 1987).

O isolamento em cultura de células, pode ser realizado em ampla variedade de células humanas e animais, sendo as mais utilizadas HEp-2 (carcinoma de laringe humano) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano) (TRISTAM e WELLIVER, 1996; HIERHOLZER *et al.*, 1993). A presença do vírus é verificada pelo aparecimento do efeito citopático (ECP) em um período que varia de 1 a 15 dias, seguido de identificação do vírus por reações com anticorpos específicos ou técnicas moleculares. Outro método utilizando cultura de células é o

shell vial, no qual as amostras são inoculadas em células, centrifugadas e incubadas por dois dias. A seguir a cultura é submetida à reação de imunofluorescência para detecção dos antígenos virais (REINA *et al.*, 2004).

A imunofluorescência (IF) é uma técnica muito utilizada para detectar o HRSV em células epiteliais da nasofaringe ou para confirmar o isolamento do vírus após a cultura de células. Esta técnica apresenta cerca de 80-90% de sensibilidade e especificidade quando comparada a técnica de isolamento (KELLOG *et al.*, 1991). Entretanto, esse método requer alguns cuidados essenciais para o seu sucesso, tais como a presença de um número adequado de células e de um microscopista treinado. A existência de excesso de muco pode gerar dificuldades de leitura, ocasionando fluorescência inespecíficas. Durante o preparo da lâmina, o muco pode ser removido ou diminuído com a adição de agentes mucolíticos como a N-acetilcisteína, ou ainda, quebrado por pipetagens sucessivas. Tanto a imunofluorescência direta quanto a indireta podem ser utilizadas para o diagnóstico do HRSV (FREKE *et al.*, 1986).

O ensaio imunoenzimático é um método rápido que permite análise de um número grande de amostras, e é aplicado tanto para a detecção de antígenos virais no material clínico como para identificação do vírus isolado em cultura de células. Os mesmos cuidados adotados na preparação do material para a imunofluorescência devem ser adotados. Estes testes, geralmente utilizam a combinação de anticorpos monoclonais (MAbs) para a captura do antígeno em fase sólida, seguida por anticorpos anti-antígenos marcados com peroxidase (CHAO *et al.*, 1979; SARKKINEN *et al.*, 1981). As vantagens destes ensaios sobre a imunofluorescência são objetividade de leitura e a possibilidade de automação.

O *Test Pack* é um ensaio imunoenzimático em membrana de nitrocelulose utilizado para a detecção de antígenos do HRSV. Disponível em forma de *Kit* comercial (Abbott, North Chicago, Illinois, EUA), o *Test Pack* é um método de diagnóstico rápido de HRSV, sendo utilizado na triagem de pacientes, porém é menos sensível do que a imunofluorescência (MILLER *et al.*, 1993).

Recentemente, outras metodologias de diagnóstico rápido, como QuickLab RSV Test (SLINGER *et al.*, 2004), Binax NOW, BD Directigen (GRÖNDAHL *et al.*, 2005), BD Directigen EZ (OHM-SMITH *et al.*, 2004), VIDAS (RIBES, *et al.*, 2002), Termo Electron™ RSV OIA (ALDOUS *et al.*, 2005) foram desenvolvidas e analisadas, porém nenhum apresentou resultado satisfatório quanto à sensibilidade e especificidade, quando comparados à IFI e isolamento em cultura (OHM-SMITH, *et al.*, 2004). Amostras com carga viral baixa, apresentam resultados falso negativo e problemas relacionados a especificidade do teste podem gerar resultados falso positivo, embora não se tenha encontrado alguma explicação para esse último. Essas metodologias de diagnóstico rápido utilizando *kits* comerciais apresentam sensibilidade e especificidade inferior aos métodos moleculares.

O diagnóstico laboratorial também pode ser realizado pela detecção do ácido nucléico viral diretamente do material clínico pela técnica de RT-PCR, que permite, também, a caracterização molecular das cepas (GILBERT *et al.*, 1996; VALDIVIA *et al.*, 1997; PITKÄRANTA *et al.*, 1998 a, b; GOTTSCHALK *et al.*, 1996; ZHENG *et al.*, 1996, METEYARD e YOUNG, 1994; PERET *et al.*, 1998 e 2000). A RT-PCR é considerada uma técnica de alta sensibilidade, especialmente útil no diagnóstico de infecções, em que tanto a quantidade quanto o período de excreção do vírus são pequenos, como é o caso de pessoas idosas (WALSH *et al.*, 2001; FREYMUTH *et al.*, 1997; FAN *et al.*, 1998; KEHL *et al.*, 2001; MULLINS *et al.*, 2004; WILLIAMS *et*

al., 2004; ROVIDA *et al.*, 2005). Vários *multiplex* PCR e RT-PCR foram desenvolvidos demonstrando sensibilidade igual ou, na maioria das vezes, superior à cultura de células convencional e outros métodos de detecção de antígenos (COIRAS, *et al.*, 2003; ROVIDA, *et al.*, 2005; WEINBERG, *et al.*, 2004).

Thomazzeli (2004), em um estudo de vigilância epidemiológica de vírus respiratórios humanos, utilizou a técnica de *GeneScan* RT-PCR para diagnóstico de vários vírus, verificando boa sensibilidade, especificidade e concordância quando comparada a imunofluorescência indireta para diagnóstico do HRSV.

Real-time PCR é uma técnica de diagnóstico que combina a RT-PCR convencional com uma tecnologia que capta os sinais da fluorescência durante os ciclos da PCR. A *real-time* PCR apresenta maior sensibilidade e especificidade quando comparada ao isolamento em cultura de células e *shell vial*. Estudo realizado em Hong Kong, durante o inverno de 2000 e 2001, visando à detecção, tipagem e quantificação do HRSV (A e B) mostrou que a *TaqMan real-time* é mais sensível do que a cultura de células convencional (HU *et al.*, 2003). O estudo realizado por van Elden e colaboradores (2003), aplicou a *real-time* PCR como método diagnóstico, concluindo que a RT *Nested* PCR e *TaqMan real-time* PCR são superiores à detecção pela cultura *shell vial*, sendo considerado um teste diagnóstico rápido e sensível na detecção do HRSV em pacientes adultos imunocomprometidos.

No entanto, o *real-time* tem custo muito elevado, além de necessitar de equipamento específico, dificultando o uso desta técnica em rotina laboratorial de diagnóstico.

A técnica de *Nested* PCR é considerada mais sensível do que a PCR por

submeter o produto de PCR a uma segunda amplificação. Porém, enfrenta um grave problema de contaminação devido ao excessivo manuseio da amostra. Assim, o desenvolvimento de um teste tão eficiente e rápido quanto a *Nested* PCR, porém com menor risco de contaminação, permitiria sua utilização em laboratórios de rotina (CLEWLEY, 1989). Walsh e colaboradores (2001), padronizaram a *Nested* PCR em tubo único para detecção do HRSV, utilizando diferentes temperaturas de hibridação para os *primers* internos e externos e a técnica de *hanging droplet Nested* PCR, na qual os reagentes para a PCR e a *Nested* são separados por uma camada de óleo durante a primeira amplificação. As duas técnicas foram comparadas com a *Nested* PCR, sendo verificado que a primeira apresentou sensibilidade inferior. Por outro lado, a *hanging droplet Nested* PCR, apresentou uma sensibilidade similar a *Nested* PCR (YOURNO, 1992, WHELEN *et al.*, 1995).

Portanto, atualmente as técnicas utilizadas para o diagnóstico do HRSV, apresentam algumas restrições. O isolamento em cultura de células é caro, demorado, requer infra-estrutura e mão de obra especializadas, fazendo com que os resultados do teste, apareçam muito tarde para serem relevantes no tratamento da doença aguda. Por outro lado, embora a imunofluorescência (IF) seja uma técnica sensível e de rápida execução, há problemas com a leitura, considerada subjetiva e cansativa requerendo, portanto, um microscopista bem treinado (WIMBEY, *et al.*, 1997). O ensaio imunoenzimático, como por exemplo o *Test Pack* (Abbott®) foi introduzido por ser um método para diagnóstico rápido, ideal para ser utilizado em triagem de pacientes, porém por apresentar um custo elevado, seu uso foi descontinuado no Brasil. A aplicação da técnica RT semi *Nested* PCR para diagnóstico do HRSV, embora de grande sensibilidade e especificidade, possui como desvantagem o excessivo manuseio da amostra aumentando o risco de

contaminação e conseqüentemente o aparecimento de resultados falso-positivos.

Uma técnica de diagnóstico rápida e ideal deve ser sensível, específica, de baixo custo e de fácil manuseio. O tempo no diagnóstico laboratorial pode ser um fator relevante para medidas efetivas individuais ou coletivas no tratamento das infecções respiratórias.

O presente trabalho visou à padronização da RT-PCR em tubo único utilizando *kit* comercial, bem como sua comparação com as metodologias tradicionais, a Imunofluorescência Indireta e a RT semi *Nested* PCR, utilizadas rotineiramente no diagnóstico laboratorial do HRSV.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Casuística

As amostras foram colhidas de 226 crianças internadas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), durante o período de maio a agosto de 2005. Os espécimes foram colhidos com consentimento pós-informado dos pais ou responsáveis, os quais assinaram um Termo de Consentimento com aprovação da Comissão Ética Médica do Hospital Universitário (ANEXO 1). Dados sobre o histórico do paciente, bem como a evolução da internação, foram obtidos dos prontuários médicos após avaliação diária pelo setor responsável pela coleta do material. Estes dados foram utilizados para o preenchimento de um questionário de internação.

2.2 Critérios de Inclusão para participação na Pesquisa

- Crianças internadas nos setores de Enfermaria da Pediatria, Berçário, Unidade de Terapia Intensiva Neonatal e Pediátrica e Retaguarda da Pediatria;
- Diagnóstico definitivo de infecção do trato respiratório;
- Crianças menores de 5 anos de idade;
- Protocolos preenchidos com todos os dados necessários para a pesquisa;
- Apenas uma colheita por internação.

2.3 Colheita das amostras

Amostras de secreções de nasofaringe e *swab* nasal foram colhidas por um técnico autorizado pela comissão de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, no máximo 48 horas após a admissão no HU-USP. Foram utilizados dois frascos contendo 4 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01M pH 7.2, esterilizada. De uma das narinas da criança, foram colhidos espécimes clínicos em um *swab* umedecido em PBS e transferido imediatamente para o mesmo frasco, contendo a solução. A outra narina foi fluidificada com 1 mL de PBS estéril proveniente do 2º frasco. Após a umidificação, foi introduzida uma sonda esterilizada (sonda uretral nº 6) que a vácuo, aspirou a secreção de nasofaringe, depositando-a num equipo de solução parenteral, também esterilizado.

O material colhido foi mantido sob refrigeração (4 °C) até ser transportado para o Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP. O processamento foi realizado em um período de até aproximadamente 4h após a colheita.

2.4 Processamento das amostras clínicas

O aspirado nasofaríngeo e o meio contendo o *swab* foram misturados, homogeneizados, tratados com 1000 U/mL de penicilina, 1000 µg/mL de estreptomicina e 50 U/mL de Nystadina (Gibco BRL®). As amostras foram separadas em 5 alíquotas: duas de 250µL para a RT-PCR adicionando-se 750µL de TRIzol® Reagent (Invitrogen™) em cada uma e estocando-as em freezer -70 °C, uma com

aproximadamente 1,5 mL, para Imunofluorescência Indireta (IFI) e duas partes para estoque em *freezer* -70 °C (500µL) adicionando-se à amostra meio de congelamento volume a volume (40% de Meio Mínimo Essencial de Eagle – MEM/Sigma Chemical Co., acrescido de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 50% de Soro Fetal Bovino – SFB/Cultilab e 10% de glicerina esterilizada – Sigma Chemical Co.), utilizando-se o método do congelamento rápido em nitrogênio líquido.

2.5 Fluxograma de trabalho

Figura 9: Fluxograma dos trabalhos realizados em laboratório a partir do material clínico colhido no HU-USP.

2.6 Reação de Imunofluorescência (IF)

2.6.1 Preparo das Lâminas

A alíquota destinada para Imunofluorescência Indireta do material clínico (IFI) foi transferida para um tubo cônico de 15 mL, sendo adicionado PBS 0,01M pH 7,2, em quantidade suficiente para completar 12 mL, seguido de centrifugação a 450x g por 10 minutos, para retirar o excesso de muco. O sobrenadante foi desprezado e o mesmo procedimento foi repetido duas vezes, resultando num total de 3 lavagens. O sedimento foi ressuspenso em 250 µL de PBS e aplicado em cada orifício da lâmina, de forma a obter, cerca de 20 células por campo, observada com um aumento de 100x em microscópio óptico. Foram preparadas duas lâminas: uma com 3 orifícios para triagem e outra com 8 orifícios para teste com anticorpos monoclonais específicos para 7 diferentes vírus respiratórios (Figura 10).

As lâminas foram secas em temperatura ambiente e fixadas com acetona P.A. (Merck) gelada (4 °C – 8 °C) por 10 minutos. A seguir foram envolvidas em papel absorvente e papel alumínio e armazenadas em freezer -20 °C, até o momento da reação.

2.6.2 Triagem das amostras por IFI e Identificação do vírus

A reação de imunofluorescência foi realizada utilizando o kit comercial “*Painel de Vírus respiratório (RSV) IFA – Biotrin*” para identificação de 7 vírus respiratórios: Influenza vírus tipo A, Influenza vírus tipo B, Parainfluenza 1, 2 e 3, Adenovírus e Vírus Respiratório Sincicial, seguindo as instruções do fabricante.

2.6.2.1 Triagem

Na primeira lâmina (Figura 10) foram aplicados, no primeiro orifício, 20 µL do monoclonal anti-HRSV, no segundo orifício 20 µL do virus *screen* (mistura de anticorpos monoclonais para os 7 vírus respiratórios) e no terceiro orifício foram adicionados 10,0 µL do controle negativo.

As lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37 °C, seguido de 2 lavagens de 10 minutos cada, em PBS-*Tween* (PBS 0,01M pH 7,2 acrescido de 0,05% de *tween* 20) e uma lavagem de 5 minutos em água destilada e após esse período, foram secas em temperatura ambiente. Em cada um dos orifícios foi aplicado 10 µL do conjugado (IgG de cabra anti-IgG de camundungo, marcado com isoticianato de fluoresceína). Após 30 minutos de incubação e lavagens, nas mesmas conduções anteriormente descritas, as lâminas foram montadas com lamínula, utilizando-se glicerina tamponada (9 partes de glicerina e 1 parte de tampão Carbonato Bicarbonato 0.5 M pH 9.0), e lidas em microscópio de fluorescência Leica DMLS com epi-iluminação.

2.6.2.2 Identificação

A segunda lâmina das amostras positivas foi submetida à reação de IFI utilizando anticorpos monoclonais específicos anti RSV, Influenza A e B (IA e IB), Parainfluenza 1, 2 e 3 (P1, P2 e P3) e Adenovirus. As incubações, lavagens e adição de conjugados foram realizadas conforme descritas anteriormente (Figura 10).

Figura 10: Esquema de distribuição do material clínico nas lâminas de triagem e identificação. As cores vermelha, verde e azul representam amostras clínicas. A) Lâmina de triagem. Cerca de 10µL das amostras foram depositados em cada um dos 3 orifícios de uma coluna da lâmina. A reação foi realizada seguindo o seguinte esquema: no sentido horizontal 1- anti HRSV, 2- virus *screen*, 3 – controle negativo B) Lâmina de identificação. Em cada orifício foram adicionados 20µL de anticorpos monoclonais na seguinte ordem: 1- anti-HRSV, 2- anti-IA, 3- anti-IB, 4-anti-P1, 5- anti-P2, 6- anti-P3, 7- anti-Adenovirus, 7- Controle negativo.

2.7 Detecção do ácido nucléico viral

2.7.1 Amostras virais padrão

Foram utilizadas, como padrão positivo as amostras de HRVS A2 (Grupo A) e CH18537 (Grupo B), gentilmente cedidas pela Dra. Marilda Siqueira (Departamento de Virologia da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil) cultivadas em células HEp-2.

2.7.1.1 Linhagem celular

Foram utilizadas as linhagens de células HEp-2, gentilmente cedida pelo Dr. Larry J. Anderson, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA-USA. As células foram cultivadas em

Meio Mínimo Essencial de Eagle – Cutilab (MEM) acrescido de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, além de 10% de SFB (ou 2% no caso de meio de manutenção). O crescimento foi feito em garrafas plásticas de 25 cm² ou 75 cm² (NUNCLON™ – Denmark ou Corning – USA) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C sendo repicadas com auxílio de solução de Tripsina-EDTA (0,25% de Tripsina 1/250 Sigma Chemical Co. e 0,02% de EDTA - Merck).

2.7.1.2 Inoculação em cultura de células

As células foram cultivadas em garrafas plásticas de 25 cm² (NUNCLON™ – Denmark) até 70-80% de confluência. O meio de crescimento foi retirado e inoculou-se 500 µL de amostra viral padrão. As células foram incubadas a 37 °C por 30 minutos para adsorção e, em seguida foi acrescentado o meio de manutenção. A incubação das células foi realizada nas mesmas condições do item 2.7.1.1, sendo diariamente observadas para o aparecimento de sincícios, efeito citopático (ECP) característico, até de cerca de duas cruzes (aproximadamente 50% das células infectadas). A seguir o tapete celular foi desprendido com o auxílio de um *scraper* e as células foram ressuspensas no próprio meio de manutenção, seguido de adição de TRIzol® Reagent (Invitrogen™) na proporção de 1:3. Esse lisado, foi distribuído em alíquotas de 1 mL e congelados em freezer -70 °C até o momento da extração do ácido nucléico.

2.7.2 Extração do RNA Total

O RNA foi extraído das amostras clínicas estocadas em TRIzol® Reagent

(Invitrogen™) e do lisado obtido da cultura de células. Todo processo de extração foi realizado em banho de gelo, utilizando centrífuga refrigerada (Eppendorf 5804R – rotor F-45-30) e reagentes gelados. A 1 mL do lisado foi adicionado 200 µL de clorofórmio (Merck), seguido de homogeneização por 15 segundos em agitador tipo *vórtex*, incubação em banho de gelo por 5 minutos e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante, fase aquosa, contendo o RNA (aproximadamente 400 µL), foi transferido para outro microtubo. O RNA foi precipitado adicionando-se 400 µL de isopropanol (Merck), seguido de homogeneização em *vórtex*, incubação por 15 minutos em gelo e centrifugação 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi acrescentado 800 µL de etanol 75% (Merck) diluído em água ultraPURE™ (Invitrogen™) seguido de centrifugação a 8.000 rpm por 8 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o sedimento foi ressuspensão em 50 µL de água ultraPURE™ (Invitrogen™) contendo 50U de Inibidor de Ribonuclease (*RNAse OUT* – Invitrogen™). O RNA extraído foi armazenado em freezer -70 °C.

2.7.3 Primers

Primers complementares aos mRNAs dos genes das glicoproteínas G (de adesão) e F (de fusão), descritos na literatura, foram utilizados para amplificar as amostras de HRSV (ZHENG *et al.*, 1996; PERET, *et al.*, 1998 e 2000).

Na PCR foram utilizados os *primers* FV e GAB, na semi *Nested* PCR, os *primers* F1AB e GAB e para a RT-PCR em tubo único, os *primers* FV e GAB (Tabela 1 e Figura 11).

Tabela 1: Relação dos *primers* utilizados na RT semi *Nested* PCR e RT-PCR em tubo único, posição no genoma, seqüências e referências:

Primer	Utilização	Posição (nt)	Seqüência (5'-3')	Referência
F1AB (-)	RT semi <i>Nested</i> PCR	3-22 gene F	CAACTCCATTGTTATTTGCC	Peret, <i>et al.</i> , 1998
FV (-)	RT-PCR em tubo único / RT semi <i>Nested</i> PCR	163-186 gene F	GTTATGACACTGGTATACCAACC	Zheng <i>et al.</i> , 1996
GAB (+)	RT-PCR em tubo único / RT semi <i>Nested</i> PCR	504-524 gene G	YCAITTTGAAGTGTTCAACTT	Peret <i>et al.</i> , 2000

Figura 11: Esquema do genoma viral e emparelhamento dos *primers* – Os genes estão identificados de acordo com a proteína que codificam e estão listados logo acima do esquema do genoma viral. Os retângulos pretos indicam a localização dos *primers* e seu emparelhamento com as fitas alvo. Os tamanhos esperados dos produtos amplificados para cada uma das reações estão indicados à direita do esquema.

2.7.4 RT-PCR em tubo único

A RT PCR em tubo único foi realizada utilizando o *Kit* comercial *AccessQuick™ RT-PCR System* (Promega), adicionando-se a 12,5 µL de *AccessQuick™ Master Mix 2x* (*Tfl* DNA Polimerase, dNTPs, cloreto de magnésio e *buffer*), 2,5U de *AMV Transcriptase Reverse*, 2,5 µL do RNA extraído, 17,5 pMoles do *primer* FV e 15 pMoles do *primer* GAB, e água (*nuclease free water*) para um volume final de 25 µL.

A seguir a reação foi levada ao termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Inc.) ou Eppendorf Mastercycler Personal, seguindo o seguinte esquema - aquecimento a 42 °C por 45 minutos (transcrição reversa), 94 °C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C por 50 segundos (denaturação das fitas) / 55 °C por 1 minuto (emparelhamento dos *primers*) / 72 °C por 1 minuto (extensão das novas fitas), uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 minutos, sendo mantido a seguir a 4 °C.

2.7.4.1 Otimização da técnica RT-PCR em tubo único

Para a otimização da técnica foram avaliadas diferentes concentrações de *primers*, mantendo constantes os demais reagentes conforme descrito no item 2.7.4. O *primer* FV foi testado nas concentrações 10, 12.5, 15, 17.5, 20 e 22.5 pMoles/reação e o GAB a 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 e 20 pMoles/reação. Os testes foram realizados utilizando o FV em quantidades superiores ao GAB.

2.7.5 RT semi *Nested* PCR

2.7.5.1 Obtenção do cDNA

A transcrição do cDNA foi realizada com o *kit* comercial *High-Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems, Inc.), na qual 25 µL de RNA extraído foram diluídos em tampão contendo 50 pMoles de *random primers*, tampão da RT 10x concentrado (50 mM de Tris-HCl [pH 8.3 a 25 °C, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), 10 mM de Dithiothreitol, 250U de *MultiScribe RT enzyme*, 40U de Inibidor de Ribonuclease, 1,5 mM de dNTP *mix* e água ultraPURE™ (Invitrogen™) para completar o volume de 50 µL. A mistura foi incubada a 25 °C por 10 minutos e 37 °C por 120 minutos no termociclador *Eppendorf ThermoStat Plus* ou termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Inc.) ou *Eppendorf Mastercycler Personal*. O cDNA obtido foi armazenado em freezer -70 °C.

2.7.5.2 Semi *Nested* PCR

A amplificação foi efetuada a partir de 2,5 µL de cDNA diluídos numa solução tampão de reação 10x concentrado [10 mM de Tris-HCl [pH 9,0], 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl (*PCR buffer* 10x – Biotools)], contendo, 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen™), 1U de Taq DNA Polimerase (Biotools), 10 pMoles de cada um dos *primes* FV e GAB e água ultraPURE™ (Invitrogen™) para um volume total de 25µL. As amostras foram amplificadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Inc.) ou *Eppendorf Mastercycler Personal*, com pré-

aquecimento a 95 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C para denaturação da fita molde, 1 minuto a 55 °C para o emparelhamento dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para a extensão das novas cadeias. Após os ciclos, foi mantido o aquecimento a 72 °C por 10 minutos de extensão final das fitas.

A semi *Nested* PCR foi realizada nas mesmas condições descritas acima, mas utilizando o produto da primeira amplificação como amostra e substituindo o *primer* FV pelo F1AB.

2.8 Análise dos produtos amplificados

Os produtos da amplificação do ácido nucléico viral das duas reações, RT semi *Nested* PCR e RT-PCR em tubo único, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen™) a 1,5% diluída em tampão TBE 1x (45mM de Tris-Borato e 1mM de EDTA [pH 8,0]) e 0,5 µg/mL brometo de etídeo. Uma mistura de 8 µL da amostra e 2 µL de azul de bromofenol (*loading buffer*) foi submetida à eletroforese, em cuba horizontal (C.B.S. EC-320 *Minicell* Submarina), em tampão TBE 1x durante 40 minutos a 100V.

A visualização do gel foi realizada em fotodocumentador Transilluminator UV (BioDoc-It™ Imaging System), sendo fotografado a seguir, para análise mais detalhada.

2.9 Sensibilidade analítica dos testes

2.9.1 Determinação da Dose Infectante de Cultura de Tecidos 50 (DICT₅₀)

2.9.1.1 Preparo das placas

As células HEp-2, 50 µL, foram cultivadas em 2 placas de 96 orifícios (NUNCLON™ – Denmark ou Corning – USA) em meio de crescimento (item 2.7.1.1)

2.9.1.2 Amostras virais padrão

Células HEp-2 foram cultivadas em 3 garrafas de 25 mm³, contendo 5,0 mL de meio MEM 10% SFB, até aproximadamente 70% de confluência da monocamada celular. O meio foi retirado de 2 garrafas e foram inoculados 500 µL do HRSV padrão A2 em uma e CH18537 na outra. As garrafas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 1 hora, após este período, foram acrescentados 5,0 mL do meio de manutenção. A outra garrafa foi utilizada como controle negativo, sendo apenas o meio de crescimento substituído por 5,0 mL de meio de manutenção.

Após a observação de sincícios, nas garrafas infectadas, a monocamada celular foi raspada e ressuspensa no próprio meio de manutenção, o qual foi distribuído em alíquotas de 1 mL. Uma alíquota foi utilizada para determinação da dose infectante de cultura de tecido (DICT₅₀) e para extração do RNA, as demais foram estocadas em freezer -70 °C.

2.9.1.3 Determinação da Dose Infectante em cultura de tecidos 50%

As alíquotas das amostras padrão, A2 e CH18537 (item 2.9.1.2), foram submetidas a diluições seriadas em múltiplos de 10, em meio de manutenção, variando de 10^{-1} até 10^{-10} . Cinquenta μL de cada diluição foram inoculados nas placas com células HEp2 com 70-80% de confluência, conforme esquema representado na figura 12.

	Puro	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	CN
1	Red	Green	Yellow	Cyan	Blue	Brown	Yellow	Magenta	Green	Orange	Pink	White
2	Red	Green	Yellow	Cyan	Blue	Brown	Yellow	Magenta	Green	Orange	Pink	White
3	Red	Green	Yellow	Cyan	Blue	Brown	Yellow	Magenta	Green	Orange	Pink	White
4	Red	Green	Yellow	Cyan	Blue	Brown	Yellow	Magenta	Green	Orange	Pink	White
5	Red	Green	Yellow	Cyan	Blue	Brown	Yellow	Magenta	Green	Orange	Pink	White
6	Red	Green	Yellow	Cyan	Blue	Brown	Yellow	Magenta	Green	Orange	Pink	White
7	Red	Green	Yellow	Cyan	Blue	Brown	Yellow	Magenta	Green	Orange	Pink	White
8	Red	Green	Yellow	Cyan	Blue	Brown	Yellow	Magenta	Green	Orange	Pink	White

Figura 12: Esquema da placa com cultura de células HEp-2 inoculada com diluições seriadas das amostras virais padrão. Cada cor representa uma diluição. CN – controle negativo.

A adsorção viral foi realizada a 37 °C, em estufa com 5% de CO_2 durante 1 hora e, posteriormente, foram adicionados 50 μL do meio de manutenção em cada orifício da placa, que foi incubada nas condições descritas no item 2.9.1.2. As leituras para verificação do ECP foram realizadas em 72 horas.

2.9.1.4 Cálculo da DICT₅₀

Os dados da titulação foram tabulados conforme esquema da tabela 2 e os cálculos realizados conforme descrito por Reed-Muench (1938).

Tabela 2: Tabulação dos dados de determinação da dose Infectante em cultura de tecidos.

Resultados acumulados					
Diluição do vírus	Nº culturas com ECP sobre culturas inoculadas	Infectados	Não infectados	Razão	%
10 ⁻¹					
10 ⁻²					
10 ⁻³					
10 ⁻⁴					
10 ⁻⁵					
10 ⁻⁶					

Para calcular a DICT 50, utilizamos o método de Reed-Muench, onde:

$$\text{Distância proporcional} = \frac{\text{Infectividade acima de 50\%} - 50\%}{(\text{infectividade acima de 50\%}) - (\text{infectividade abaixo de 50\%})}$$

$$\text{DICT}_{50} = \text{Log diluição acima 50\%} - (\text{D.P.} \times 1) = \text{Log } \underline{\hspace{2cm}} - \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\text{DICT}_{50} = \underline{\hspace{4cm}}$$

$$\text{Título do Vírus} = \underline{\hspace{4cm}}$$

2.9.2 Limiar de sensibilidade das técnicas RT-PCR em tubo único e RT semi *Nested* PCR

Os testes diagnósticos podem ser avaliados por parâmetros de sensibilidade e especificidade, os quais podem ser analisados em dois contextos: analítico e diagnóstico. A sensibilidade analítica refere-se a menor quantidade do analito que pode ser detectada pelo teste, ou seja, quanto maior for a capacidade do teste de detectar pequenas quantidades do analito maior é a sua sensibilidade.

Para determinar o limiar de sensibilidade, das técnicas RT-PCR em tubo único e RT semi *Nested* PCR, foram utilizadas as diluições seriadas (em múltiplos de 10).

A 250 µL de cada diluição (item 2.9.1.3) foi adicionado 750 µL TRIzol[®] Reagent (Invitrogen[™]) e o RNA total foi extraído conforme descrito no item 2.7.2. Posteriormente foram submetidas às técnicas de RT-PCR em tubo único (item 2.7.4) e RT semi *Nested* PCR (item 2.7.5).

2.10 Tabulação e análise dos resultados

As técnicas de IFI do material clínico (IFI), RT semi *Nested* PCR e RT-PCR em tubo único foram comparadas, quanto à sensibilidade, especificidade e eficiência, de acordo com o método descrito por Armitage and Berry (1994). Os dados foram tabulados de acordo com o esquema na tabela 3.

A especificidade analítica refere-se à capacidade do teste de detectar somente o analito e não outras substâncias de estruturas semelhantes. Já a especificidade diagnóstica refere-se à capacidade do teste de classificar como negativo o indivíduo que não possui o parâmetro em diagnóstico, ou seja, um teste apresentará alta especificidade diagnóstica quanto maior for sua capacidade de classificar como negativo um paciente que não possua o parâmetro em diagnóstico, ou seja, a proporção dos verdadeiros negativos (GARDNER e GREINER, 2000)

Utilizando os dados tabulados conforme o esquema proposto na tabela 3 podemos estabelecer a especificidade e eficiência do teste em estudo pelas seguintes relações:

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

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

2.10.2 Método estatístico de Kappa (k)

O método estatístico de Kappa (KRAMER e FEINSTEIN, 1981) foi utilizado para a determinação do grau de concordância entre as técnicas de diagnóstico, excluindo a concordância ao acaso. Os dados foram analisados utilizando a seguinte fórmula:

$$K = P_0 - P_e / 1 - P_0$$

Sendo:

$$P_0 = A + D / N \text{ (proporção esperada de concordância)}$$

$$P_e = (A + B) (A + C) + (C + D) (B + D) / N^2 \text{ (proporção esperada de concordância, por chance).}$$

$$N = A + B + C + D$$

São sugeridos os seguintes níveis quantitativos de significância para o valor de k:

k < 0	concordância pobre
k de 0,00 – 0,20	concordância fraca
k de 0,21 – 0,40	concordância regular
k de 0,41 – 0,60	concordância moderada
k de 0,61 – 0,80	concordância substancial
k de 0,81 – 1,00	concordância quase perfeita

3 RESULTADOS

3.1 Amostras clínicas

As amostras foram colhidas de pacientes menores de cinco anos de idade, atendidos no HU-USP, entre os meses de maio a agosto de 2005, apresentando sintomatologia característica de doença respiratória: pneumonia, bronquiolite, laringite, broncoespasmos (BCE), broncopneumonia (BCP) e infecções das vias aéreas superiores (IVAs). Do total de 226 amostras, 102 (45,1%) foram positivas para o HRSV. A distribuição dos casos positivos por mês está descrita na tabela 4.

Tabela 4: Número de amostras testadas e número de amostras positivas para o HRSV (mês a mês) referente ao período de maio a agosto de 2005.

<i>Mês</i>	<i>Nº Amostras colhidas</i>	<i>Amostras Positivas</i>	
		<i>Nº</i>	<i>%</i>
Maio	70	37	52,8
Junho	85	44	51,8
Julho	46	20	43,5
Agosto	25	1	4,0
TOTAL	226	102	45,1

3.2 Imunofluorescência Indireta (IFI)

Das 226 amostras testadas pela técnica de IFI, 116 (51%) foram negativas, 84 (37%) foram positivas para o HRSV e 26 (11,5%) amostras foram consideradas inconclusivas devido à falta de células ou presença de muco durante a preparação da lâmina de IFI (Figura 13).

Figura 13: Fotomicrografia da IFI de células HEp-2. A – células não infectadas; B – células infectadas com HRSV (aumento de 200x; microscópio de fluorescência LEICA com epi-iluminação).

3.3 RT-PCR em tubo único

A amplificação das amostras pela RT-PCR tubo único, gerou um produto de 653 pb para o grupo A e 656 pb para o grupo B (Figura 14).

Para a otimização da técnica foram avaliadas diferentes concentrações de *primers* mantendo-se constantes os demais reagentes. As reações foram realizadas com as seguintes concentrações de *primers* FV e GAB: a) 10 e 7.5 pMoles , b) 12.5 e 10 pMoles ; c) 15 e 12.5 pMoles d) 17.5 e 15 pMoles ; e) 20 e 17.5 pMoles; f) 22.5 e 20 pMoles , respectivamente (Figura 15).

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídeo dos produtos da RT-PCR em tubo único para os genes G e F. Colunas: PM - Marcador de peso molecular 100 pb DNA *ladder* (InvitrogenTM), Coluna 1: Padrão Positivo grupo A, Coluna 2: Padrão Positivo grupo B, Coluna 3: Controle Negativo (Água).

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídeo dos produtos da RT-PCR em tubo único para os genes G e F realizada com diferentes concentrações de *primers*. Colunas: PM - Marcador de peso molecular 100 pb, Colunas 1,3,5,7,9 e 11 correspondem ao produto amplificado do padrão do grupo A e colunas 2,4,6,8,10 e 12 ao padrão do grupo B. Colunas 1 e 2: 10 e 7.5 pMoles dos *primers* FV e GAB respectivamente, Colunas 3 e 4: 12.5 e 10 pMoles, Colunas 5 e 6: 15 e 12.5 pMoles, Coluna 7 e 8: 17.5 e 15 pMoles, Coluna 9 e 10: 20 e 17.5 pMoles, Colunas 11 e 12 : 22.5 e 20 pMoles, Coluna 13: Marcador de peso molecular 100 pb.

A reação final foi realizada utilizando 17,5 pMoles do *primer* FV e 15 pMoles do *primer* GAB.

Das 226 amostras clínicas testadas pela técnica RT PCR em tubo único, 134 (59,3%) foram negativas e 92 (40,7%) foram positivas para o HRSV. Algumas amostras apresentaram produto da PCR maior que o esperado, com ~700 pb (Figura 16).

Figura 16: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídeo dos produtos da RT-PCR em tubo único para os genes G e F. Colunas: PM - Marcador de peso molecular 100 pb Colunas 1: amostra – BR05149, Coluna 2: amostra BR05154, Coluna 3: amostra BR05159, Coluna 4: amostra BR05222, Coluna 5: amostra BR05236, Coluna 6: amostra BR05237, Controle Negativo (Água).

3.4 RT semi *Nested* PCR

A amplificação pela RT-PCR gerou um produto de 653 pb para o grupo A e 656 pb para o grupo B e pela semi *Nested* PCR gerou um produto de 489 pb para o grupo A e 492 pb para o grupo B (Figura 17).

Das 226 amostras clínicas testadas pela técnica RT semi *Nested* PCR, 130 (58%) foram negativas e 96 (42,5%) foram positivas para o HRSV. Algumas amostras apresentaram um produto acima do esperado com aproximadamente 540pb (Figura 18).

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídeo dos produtos da PCR e da semi *Nested* PCR para os genes G e F. Colunas: PM - Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen™). Colunas de 1 a 3, referem-se aos produtos da semi *Nested* PCR (489 e 492 pb). Coluna 1: Padrão Positivo grupo A, Coluna 2: Padrão Positivo grupo B, Coluna 3: Controle Negativo. Colunas de 5 a 7, referem-se aos produtos da PCR (653 e 656 pb). Coluna 5: Padrão Positivo grupo A, Coluna 6: Padrão Positivo grupo B, Coluna 7: Controle Negativo (Água).

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídeo dos produtos da RT-PCR em tubo único para os genes G e F. Colunas: PM - Marcador de peso molecular 100 pb Colunas 1: amostra BR05271, Coluna 2: amostra BR05274, Coluna 3: amostra BR05275, Coluna 4: amostra BR05278, Coluna 5: amostra BR05293, Coluna 6: Controle Negativo (Água).

3.5 Sensibilidade Analítica dos testes

3.5.1 Determinação da DICT₅₀

As amostras virais padrão do grupo A (A2) e B (CH18537) foram tituladas (itens 2.9.1.1 a 2.9.1.3) e a leitura das placas inoculadas realizada após 72 horas de incubação. Os resultados foram tabulados e analisados conforme item 2.9.1.4.

Tabela 5: Resultados da DICT₅₀ referente à titulação em log 10 em cultura de células após 48 horas da inoculação do HRSV do grupo A.

<i>Diluição</i>	<i>Nº de culturas infectadas com ECP culturas inoculadas</i>	<i>Infectadas</i>	<i>Não infectadas</i>	<i>Razão</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
-1	8/8	30	0	30/30	100
-2	8/8	22	0	22/22	100
-3	5/8	14	3	14/17	82,3
-4	3/8	9	8	9/17	52,9
-5	2/8	6	14	6/20	30
-6	2/8	4	20	4/24	16,6
-7	1/8	2	27	2/29	6,8
-8	1/8	1	34	1/35	2,8
-9	0/8	0	42	42/0	0
-10	0/8	0	50	50/0	0
Controle neg	0/8	0	58	58/0	0

$$\text{Distância proporcional} = \frac{52,9 - 50}{52,9 - 30} = \frac{2,9}{22,9} = 0,12$$

$$(-4) + (-0,12) = -4,12 \quad \text{DITC}_{50} = 10^{-4,12}$$

Antilog de 4,12 = 13182, ou seja, em 50 µL do padrão HRSV-A contém 13182 DITC₅₀.

Tabela 6: Resultados da DICT₅₀ referente à titulação em log 10 em cultura de células após 48 horas da inoculação do HRSV do grupo B.

<i>Diluição</i>	<i>N° de culturas infectadas com ECP/ culturas inoculadas</i>	<i>Infectadas</i>	<i>Não infectadas</i>	<i>Razão</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
-1	5/8	16	3	16/19	84,2
-2	4/8	11	7	11/18	61,1
-3	3/8	7	12	7/19	36,8
-4	2/8	4	18	4/22	18,1
-5	1/8	2	25	2/27	7,4
-6	1/8	1	32	1/33	3,0
-7	0/8	0	40	0/40	0
-8	0/8	0	48	0/48	0
-9	0/8	0	56	0/56	0
-10	0/8	0	64	0/64	0
Controle neg	0/8	0	72	0/72	0

$$\text{Distância proporcional} = \frac{61,1 - 50}{61,1 - 36,8} = \frac{11,1}{24,3} = 0,45$$

$$(-2) + (-0,45) = -2,45 \quad \text{DITC}_{50} = 10^{-2,45}$$

Antilog de 2,45 = 281, ou seja, em 50 µL do padrão HRSV-B contém 281 DITC₅₀.

3.5.2 Limiar de detecção da RT-PCR em tubo único e RT semi *Nested* PCR

A sensibilidade das técnicas para a detecção do HRSV foi avaliada utilizando-se as amostras, padrão A2 (grupo A) e CH18537 (grupo B) puras e em sucessivas diluições múltiplas de 10. Os produtos obtidos, das técnicas de RT-PCR em tubo único e RT semi *Nested* PCR, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, conforme descrito no item 2.8 (Figuras 19, 20, 21 e 22).

Figura 19: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídeo dos produtos da RT-PCR tubo único para os genes G e F grupo A. Colunas: PM - Marcador de peso molecular 100 pb, Coluna 1: Padrão Positivo grupo A, Colunas 2 a 11 – padrão positivo grupo A em diluição seriada em múltiplos de 10 (de 10^{-1} a 10^{-10}) CN: Controle Negativo (Água).

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídeo dos produtos da RT-PCR tubo único para os genes G e F grupo B. Colunas: PM - Marcador de peso molecular 100 pb, Coluna 1: Padrão Positivo grupo B, Colunas 2 a 11 – padrão positivo grupo B em diluição seriada em múltiplos de 10 (de 10^{-1} a 10^{-10}) CN: Controle Negativo (Água).

Figura 21: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídeo dos produtos da RT semi *Nested* PCR para os genes G e F. Colunas: PM - Marcador de peso molecular 100 pb, Coluna 1: Padrão Positivo grupo A, Colunas 2 a 11 – padrão positivo grupo A em diluição seriada em múltiplos de 10 (de 10^{-1} a 10^{-10}) CN: Controle Negativo (Água).

Figura 22: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídeo dos produtos da RT semi *Nested* PCR para os genes G e F. Colunas: PM - Marcador de peso molecular 100 pb, Coluna 1: Padrão Positivo grupo B, Colunas 2 a 11 – padrão positivo grupo B em diluição seriada em múltiplos de 10 (de 10^{-1} a 10^{-10}) CN: Controle Negativo (Água).

Conforme observado nas figuras 19 e 20 a RT-PCR em tubo único detectou a presença do ácido nucléico até a diluição 10^{-2} para o padrão do grupo A (6.59 DICT₅₀) e até a diluição 10^{-1} para o padrão do grupo B (1.405 DICT₅₀). Já a RT semi *Nested* PCR detectou até a diluição 10^{-3} (0.659 DICT₅₀) para o padrão do grupo A e até a diluição 10^{-1} para o padrão do grupo B (1.405 DICT₅₀) (Figuras 21 e 22).

3.6 Análise dos resultados obtidos pela RT-PCR em tubo único, RT semi *Nested* PCR e IFI das amostras clínicas de 2005

Os resultados obtidos pelas técnicas RT-PCR em tubo único, RT semi *Nested* PCR e IFI, foram tabulados e analisados conforme item 2.9.1.4.

Das 226 amostras clínicas testadas, 102 (45,1%) foram positivas em pelo menos uma das três técnicas, sendo 75 (33,2%) positivas pelos três métodos testados. Vinte e seis (11,5%) amostras foram consideradas inconclusivas pela IFI. Três amostras (1,3%) foram positivas por IFI e RT-PCR semi *Nested*, 1 (0,4%) foi positiva por IFI e RT-PCR tubo único, 5 (2,2%) foram positivas somente por IFI e 2 (0,9%) foram positivas somente por RT semi *Nested* PCR. Dezesesseis (7,0%) amostras foram positivas pela RT semi *Nested* PCR e RT-PCR em tubo único, sendo que dessas, 5 (31,2%) foram consideradas inconclusivas para a IFI (tabela 7).

Tabela 7: Número de amostras com diagnóstico positivo para o HRSV por diferentes técnicas e suas respectivas porcentagens.

Técnica (s) analisada (s)	Nº Amostras Positivas	Porcentagem (%)
IFI ou RT-PCR em tubo único ou RT semi <i>Nested</i> PCR	102	45,1
IFI, RT-PCR em tubo único e RT semi <i>Nested</i> PCR	75	33,2
Inconclusivas por IFI (ausência de células)	26	11,5
IFI e RT semi <i>Nested</i> PCR	3	1,3
IFI e RT-PCR em tubo único	1	0,4
Somente por IFI	5	2,2
Somente por RT semi <i>Nested</i> PCR	2	0,9
semi <i>Nested</i> PCR e RT-PCR em tubo único	16	7,0

3.7 Análise estatística

As tabelas 8 a 10 demonstram as técnicas que foram comparadas entre si quanto ao diagnóstico do HRSV e o número de amostras utilizadas para a comparação. As técnicas foram inicialmente comparadas tendo a IFI como “padrão ouro” (Tabelas 8 e 9). Foram calculados os parâmetros de sensibilidade, especificidade e eficiência conforme descrito no item 2.10.

Posteriormente a RT-PCR em tubo único foi comparada com a RT semi *Nested* PCR, mantendo-se a última como “padrão ouro” (Tabela 10).

Tabela 8: Número de amostras utilizadas na comparação entre IFI e a RT-PCR tubo único para o diagnóstico do HRSV utilizando 200 amostras.

* Foram excluídas as 26 amostras consideradas inconclusivas na IFI.

Imunofluorescência Indireta				
RT-PCR Tubo único		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
	POSITIVO	76	11	87
	NEGATIVO	8	105	113
	TOTAL	84	116	200*

Tabela 9: Número de amostras utilizadas na comparação entre IFI e RT semi *Nested* PCR para o diagnóstico do HRSV utilizando 200 amostras testadas.

* foram excluídas 26 amostras inconclusivas na IFI.

Imunofluorescência Indireta				
RT semi <i>Nested</i> PCR		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
	POSITIVO	78	13	91
	NEGATIVO	6	103	109
	TOTAL	84	116	200*

Tabela 10: Número de amostras utilizadas na comparação entre RT-PCR tubo único e RT semi *Nested* PCR para o diagnóstico do HRSV utilizando 226 amostras.

RT semi <i>Nested</i> PCR				
RT-PCR tubo único		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
	POSITIVO	91	1	92
	NEGATIVO	5	129	134
	TOTAL	96	130	226

A sensibilidade, especificidade e eficiência da RT-PCR em tubo único quando comparada com a IFI (considerada como padrão/referência) foi de 90.5, 90.5 e 80.1% respectivamente. Em comparação com a RT semi *Nested* PCR (considerada padrão/referência) foi 94.8, 99.2 e 97.3% respectivamente. Já a RT semi *Nested* PCR quando comparada com a IFI (considerado padrão/referência) foi de 92.8, 88.8 e 80.1% respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11: Valores de sensibilidade, especificidade e eficiência obtidos na comparação entre a RT-PCR tubo único x IFI, RT semi *Nested* PCR x IFI e RT-PCR tubo único x RT semi *Nested* PCR.

	RT-PCR tubo único -PCR x IFI	RT semi <i>Nested</i> PCR x IFI	RT-PCR tubo único x RT semi <i>Nested</i> PCR
Sensibilidade	90.5 %	92.8 %	94.8 %
Especificidade	90.5 %	88.8 %	99.2 %
Eficiência	80.1%	80.1%	97.3%

Posteriormente o grau de concordância entre as técnicas foi avaliado pelo método estatístico de Kappa. Efetuando os cálculos entre as técnicas, observamos uma concordância substancial entre as técnicas RT-PCR em tubo único x IFI ($k = 0,79$), e RT semi *Nested* PCR x IFI ($k = 0,80$), enquanto que entre as técnicas RT-PCR tubo único e RT semi *Nested* PCR foi observada uma concordância quase perfeita ($k = 0,94$) (Tabela 12).

Tabela 12: Comparação entre as técnicas RT-PCR em tubo único, RT semi *Nested* PCR e IFI quanto ao grau de concordância utilizando o método estatístico de kappa.

Técnica avaliada	Valor de (k)	Concordância
IFI e RT-PCR tubo único	0,79	Substancial
IFI e RT semi <i>Nested</i> PCR	0,80	Substancial
RT semi <i>Nested</i> PCR e RT-PCR tubo único	0,94	Quase Perfeita

4 DISCUSSÃO

O HRSV é o principal patógeno relacionado a infecções do trato respiratório inferior em lactentes, crianças em idade pré-escolar e idosos, com incidência entre crianças hospitalizadas variando de 26% a 41% (BYINGTON *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 1991; SUTMÖLLER *et al.*, 1995; MIYAO *et al.*, 1999; AVENDANO *et al.*, 1991; AVILA *et al.*, 1990; BEDOYA *et al.*, 1996; CABRERA ROCA *et al.*, 1997; FORSTER *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2004; OHM-SMITH *et al.*, 2004; KUYPERS *et al.*, 2004). Das 226 amostras estudadas, 102 (45,1%) foram positivas para o HRSV, em pelo menos uma das técnicas avaliadas, confirmando a importância desse patógeno.

A epidemia do HRSV apresenta sazonalidade característica, com incidência elevada no outono tardio, inverno ou início da primavera, cerca de 40% dos casos ocorre nos meses de pico, geralmente no meio do surto (COLLINS, 1996). Estudos realizados em diferentes localidades no Brasil demonstraram uma sazonalidade típica, com surtos ocorrendo entre os meses de março a setembro e com picos de incidência nos meses de abril, maio e junho (BOSSO *et al.*, 2003; LEAL *et al.*, 2005; TAKAHASHI *et al.*, 2001; BOTOSSO, 1997). As amostras utilizadas, no presente trabalho, datam dos meses de maio até agosto sendo observado que mais de 99% dos casos positivos para o HRSV ocorreram de maio a julho (Tabela 3).

O HRSV é dividido em dois grupos A e B, sendo que a maior diferença está na glicoproteína G (MUFSON *et al.*, 1985; JOHNSON *et al.*, 1987; HENDRY *et al.*, 1988). Os dois grupos apresentam co-circulação durante os surtos, com predominância do grupo A, dependendo do local e do ano (ANDERSON *et al.*, 1991; VIEGAS *et al.*, 2005; FRABASILE *et al.*, 2003; SCOTT *et al.*, 2004; ZLATEVA *et al.*,

2004; GILCA *et al.*, 2006; HENDRY *et al.*, 1986; LUKIC-GRILIC *et al.*, 1998). Zlateva e colaboradores (2004 e 2005) identificaram sítios sob pressão seletiva positiva no ectodomínio externo da proteína G, de amostras do grupo A e B, sugerindo pressão imune sobre esse códon. As alterações desses sítios podem possibilitar o escape da imunidade preexistente e, conseqüentemente, a re-infecção da população (ZLATEVA *et al.*, 2005).

A análise da variabilidade genética do gene G permitiu a divisão em genótipos. Durante um surto verifica-se a co-circulação de vários genótipos, com predominância de um ou dois que podem, tanto persistir no decorrer dos anos, como ter a circulação diminuída até o desaparecimento. A dinâmica de circulação do HRSV pode ser influenciada pela seleção natural, devida à imunidade adquirida pela população e aos processos epidemiológicos neutros, como a dispersão espacial da população (ZLATEVA, *et al.* 2005).

Os produtos amplificados de algumas amostras de São Paulo, migraram mais lentamente no gel de agarose que outras amostras, apresentando padrão de banda maior que o esperado (aproximadamente 700 pb pela RT-PCR em tubo único e 540 pela RT semi *Nested* PCR), (Figuras 16 e 18). As seqüências da porção variável G2, destas amostras quando alinhadas com outras disponível no GenBank, mostraram a presença de 60 nucleotídeos extra na porção correspondente ao nucleotídeo 792 da cepa CH18537. Essa inserção, corresponde a uma duplicação da região *upstream* do gene, que foi identificada pela primeira vez em duas amostras isoladas em Buenos Aires em 1999 (TRENTO *et al.*, 2003). Nos últimos seis anos, esse novo genótipo foi detectado em outras regiões do mundo (SCOTT *et al.*, 2004; TRENTO *et al.*, 2003; NAGAI *et al.*, 2004). Os isolados de HRSV-B, portanto, podem acomodar drásticas mudanças na proteína G, como a inserção e a deleção de

nucleotídeos, presença de códons de finalização prematuros

O diagnóstico direto da infecção pelo HRSV, pode ser realizado pela detecção dos antígenos virais por imunofluorescência ou ELISA, pela detecção do ácido nucléico, pela RT-PCR, RT semi *Nested* PCR ou pelo isolamento em cultura. A cultura celular apresenta limitações devido à sensibilidade diagnóstica, ao tempo para o diagnóstico (~15dias) e a necessidade de instalações especiais sendo, entretanto, ainda, é considerada o método padrão (WARIS, 1992).

O diagnóstico laboratorial do HRSV, rotineiramente, é realizado pela imunofluorescência para detecção dos antígenos virais, diretamente do material clínico. O diagnóstico rápido do HRSV é importante não só para evitar o uso desnecessário de antibióticos em casos de infecções virais, bem como tomar providências pertinentes, a fim de evitar as infecções hospitalares causadas pelo vírus (ALDOUS *et al.*, 2004; LADWIG *et al.*, 2005). Nos casos confirmados a terapia com o antiviral ribavirina pode ser iniciada (ENGLUND *et al.*, 1997; HALL *et al.*, 2001). A IFI apresenta a vantagem de ser rápida, sensível, apresentando 80-90% de sensibilidade e especificidade quando comparada ao isolamento viral (KELLOG, 1991). No entanto, a subjetividade da leitura pode dificultar o diagnóstico (WIMBEY *et al.*, 1997).

kits comerciais de diagnóstico rápido, prático e de fácil manuseio, foram desenvolvidos, incluindo ensaios imunoenzimáticos e de imunocromatografia. Onm-Smith e colaboradores (2004), analisaram a eficiência desses testes e da IFI em comparação ao isolamento em cultura para a detecção do HRSV em crianças e adultos. A IFI em comparação ao teste imunoenzimático BD Directigen RSV - DRSV (Bencton Dickinson and Company) e aos testes de imunocromatografia, NOW (Binax, Inc., Portland, Maine) e BD Directigen EZ (Bencton Dickinson and Company,

Sparks, Md.), apresentou melhor sensibilidade (93%) em contrapartida aos demais, que apresentaram resultados variando entre 59% e 89%. Quanto à especificidade, os resultados variaram entre 96% (DRSV) e 100% (NOW). Entretanto, nenhum dos três testes rápidos foi sensível para detecção do HRSV em adultos (sensibilidade variando entre 0% e 25%), demonstrando que, embora práticos e rápidos apresentam limitações na sensibilidade, necessitando, muitas vezes de confirmação por um segundo teste.

A RT-PCR é considerada um método rápido de detecção do HRSV (FALSEY, *et al.*, 2002), apresentando alta sensibilidade e sendo útil no diagnóstico de infecções, em que tanto a quantidade quanto o período de excreção do vírus são pequenos, particularmente em idosos (WALSH *et al.*, 2001). Recentemente, um estudo sobre o diagnóstico das principais viroses causadoras de doenças agudas do trato respiratório inferior em crianças, concluiu que a RT-PCR é mais sensível do que o isolamento viral para detecção do HRSV em amostras clínicas, aumentando o número de casos identificados em até duas vezes (WEINBERG *et al.*, 2004; KUROIWA *et al.*, 2004). A *Nested* PCR é considerada uma técnica sensível por aumentar o limite de detecção, uma vez que o material é submetido a uma segunda amplificação, entretanto há grande risco de resultados falso positivo (BELÁK e THORÉN 2001; HAKHVERDYAN *et al.*, 2004).

Considerando a necessidade de um método, sensível, específico, rápido e com baixo custo para o diagnóstico de infecções por HRSV, o presente trabalho padronizou uma RT-PCR em único tubo para a detecção do HRSV. Após a padronização do teste, este foi avaliado com amostras clínicas.

Durante o ano de 2005, entre os meses de maio a agosto, foram analisados um total de 226 amostras clínicas pela RT semi *Nested* PCR, RT-PCR em tubo único e Imunofluorescência Indireta.

A RT-PCR em tubo único apresentou um desempenho semelhante a RT semi *Nested* PCR, com sensibilidade, especificidade e eficiência de 94.8%, 99.2% e 97.3% respectivamente, e $k = 0,94$, entretanto, tem a grande vantagem de ser realizada em única etapa, diminuindo desta forma o manuseio das amostras e conseqüentemente o risco de contaminação, A utilização de um único tubo facilita, ainda, o trabalho dos laboratoristas, proporcionando menores chances de erro além da diminuição do tempo de diagnóstico e dos custos.

Dentre as amostras testadas, 5 foram positivas apenas pela RT semi *Nested* PCR, correspondendo a 5,4% do total de amostras detectadas pelas duas técnicas. Esse resultado é esperado na *Nested* PCR, uma vez que a segunda amplificação aumenta a sensibilidade do método. O limiar de detecção da *Nested* foi pelo menos 10x maior que a RT-PCR tubo único para o grupo A e semelhante para o grupo B (Figuras 19, 20, 21 e 22). A diferença de resultado sugere que a carga viral, dos 5,4% das amostras, era baixa, sendo possível detectá-las apenas após a segunda amplificação.

Resultados semelhantes foram obtidos por Hakhverdyan e colaboradores (2004), que compararam uma RT-PCR em tubo único utilizando a *rTth* DNA polimerase (enzima que atua como transcriptase durante a RT e também como polimerase durante a PCR), com a Ag-ELISA, PCR convencional, *Nested* PCR e isolamento viral, mostrando que a sensibilidade da RT-PCR em tubo único em comparação a *Nested* PCR foi de 94.7%, ou seja, a *Nested* PCR por submeter-se a uma segunda amplificação, aumentou a detecção do bRSV em 4% (1/25) de

positividade. Quando comparado com as demais técnicas inclusive com a PCR convencional, a RT-PCR em tubo único foi no mínimo 7% mais sensível.

Por outro lado, em nosso estudo comparando as três técnicas, 1 amostra (1,9%) foi positiva apenas pela RT-PCR em tubo único e na IFI. Essa divergência pode ter ocorrido devido a algum problema na obtenção do cDNA, ocasionado ou por problemas nos reagentes ou erro técnico, ou por problemas de armazenagem do mesmo.

A RT-PCR em tubo único foi realizada utilizando o *kit* comercial AccessQuick™ RT-PCR System, o qual recomenda que as reações sejam realizadas para um volume final de 50 µL. Para minimizar os custos do diagnóstico, reduzimos pela 25µL o volume total por reação da RT-PCR tubo único gerando uma economia de 50% nos custos com reagentes. Para avaliar se a redução de volume poderia interferir na sensibilidade da técnica, todas as amostras da RT-PCR em tubo único que apresentaram resultado divergente, em relação à RT semi *Nested* PCR e/ou IFI, foram testadas novamente com um volume final de reação de 50µL. Todos os resultados foram concordantes.

Onze (4,9%) (Tabela 7) e 13 (5,7 %) (Tabela 8) amostras foram positivas pelas RT-PCR em tubo único e RT semi *Nested* PCR, respectivamente e negativas para a IFI, demonstrando uma maior sensibilidade das técnicas moleculares para o diagnóstico do HRSV. A sensibilidade e a eficiência da a RT-PCR em tubo único e RT semi *nested* PCR em comparação a IFI foram de 90,5 %, 80.1% e 92,8%, 80.1% respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Hu *et al.* (2002); Aldous *et al.* (2004) e Bosso *et al.* (2003), que compararam a IFI com as técnicas moleculares RT-PCR e *Nested* PCR. Takahashi (2001) verificou que a RT-PCR foi capaz de detectar 10% mais amostras que a IFI. Estudos demonstraram que o

número de casos detectados pela RT-PCR aumenta de 2 a 19% quando comparado a outros métodos convencionais, incluindo, imunofluorescência (KUYPERS *et al.*, 2004; GUEUDIN *et al.*, 2003; HU *et al.*, 2003; ONG *et al.*, 2001), isolamento em cultura de células e ensaio imunoenzimático (KUYPERS *et al.*, 2004; KEHL *et al.*, 2001; HENKEL *et al.*, 1997)

Por outro lado, 8 (3,54%) amostras foram positivas para a IFI e negativas para a RT-PCR em tubo único (Tabela 8) e 6 (2,65%) para RT semi *Nested* PCR (Tabela 9), sugerindo que possa ter ocorrido degradação do ácido nucléico ou a presença de inibidores nas amostras clínicas (HERRMANN *et al.*, 2001). Das 26 amostras inconclusivas pela IFI, 5 (19,2%) foram positivas para RT-PCR em tubo único e RT semi *Nested* PCR. Este resultado demonstra que além dos problemas de menor sensibilidade diagnóstica a IFI apresenta limitações inerentes ao processamento ou à própria amostra clínica, como o excesso de muco ou número de células insuficientes (DOMINGUEZ *et al.*, 1993).

A utilização da RT-PCR em tubo único representou uma economia de cerca de 20% nos custos do material de consumo, em comparação à RT semi *Nested* PCR (ANEXO 3). O tempo total de execução da RT semi *Nested* PCR, partindo do RNA extraído, foi de 7 a 8 horas (HAKHVERDYAN *et al.*, 2004), por outro lado a RT-PCR em tubo único requer menos do que 4 horas para a execução, gerando, portanto, uma redução de aproximadamente 50% no tempo total do diagnóstico, além da liberação do termociclador.

A imunofluorescência, requer entre o preparo da lâmina e a execução da reação e leitura, aproximadamente 4 horas para liberação dos resultados, tempo semelhante ao da RT-PCR tubo único. Quanto ao custo da reação/paciente é de R\$ 150,00 (ANEXO 3), apresentando, no entanto, a vantagem da detecção simultânea

de sete diferentes vírus respiratórios. Por outro lado, a interpretação da IFI depende de técnicos muito bem treinados.

A RT-PCR em tubo único apresentou sensibilidade, especificidade e eficiência e $k = 0.94$, comparáveis à RT semi *Nested* PCR com a vantagem de ser mais rápida, prática e econômica, sendo, portanto aplicável ao diagnóstico rotineiro do HRSV. Em relação a IFI, apesar do tempo gasto ser semelhante, mesmo com técnicos bem treinados, os problemas de subjetividade relacionados à leitura não são eliminados, o custo, por outro lado, o custo dificilmente será diminuído, uma vez que o *Kit* utilizado contempla sempre o painel de vírus respiratórios. Entretanto, os resultados discrepantes observados entre os três métodos, sugerem a necessidade de pelo menos duas metodologias para obter um diagnóstico conclusivo.

A praticidade, a simplicidade e os custos de uma técnica de diagnóstico são cruciais para implantação em um laboratório de rotina. Desse modo, a RT-PCR tubo único, apresenta-se como uma alternativa que satisfaz a esses requisitos.

5 CONCLUSÃO

- A RT-PCR em tubo único foi um método de detecção do HRSV rápido, sensível e específico;
- Os custos por reação da RT-PCR em tubo único foram inferiores à RT semi *Nested* PCR e a IFI, embora a última permite a detecção de sete vírus simultaneamente;
- A RT-PCR em tubo único foi uma técnica rápida de diagnóstico, 50% do tempo gasto para execução da RT semi *Nested* PCR e aproximadamente o mesmo tempo de execução que a IFI;
- A IFI apresentou sensibilidade e especificidade inferior às técnicas moleculares RT semi *Nested* PCR e RT-PCR em tubo único;
- A RT-PCR em tubo único é uma alternativa de diagnóstico para o HRSV em crianças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDOUS, W. K.; KRIS, G.; TARGGAT, E. W.; RUPP, J.; WINTCH, J.; DALY, J. A. A comparison of Thermo Electron™ RSV OIA® to viral culture and direct fluorescent assay for respiratory syncytial virus. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 224-228, 2005.

ANDERSON, L. J.; *et al.* Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **J. Infect. Dis.**, V.151, 4:626-633, 1985

ANDERSON, L. J.; BINGHAM, P.; HIERHOLZER, J. C.; Neutralization of respiratory syncytial virus by individual and mixture of F and G protein monoclonal antibodies. **J. Virol.** 62:4232-38, 1988.

ANDERSON, L. J.; PARKER, R. A.; STRIKAS, R. L. Association between respiratory syncytial virus outbreaks and lower respiratory tract deaths of infants and young children. **J. Infect. Dis.**, 161: 640-646, 1990.

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

ARBIZA, J.; BEIROS, M.; DELFRARO, A.; FRABASILE, S.; MITOMA, F. D.; MILK, R.; RUSSI, J. C. Genetic characterization of respiratory syncytial viruses isolated from consecutive acute respiratory infections in a HIV infected child. **J. Clin. Virol.**, 2005.

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

ATREYA, P. A.; PEEPLES, M.; COLLINS, P. C. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. **J. Virol.**, 72: 1452-61, 1998.

AUSAR, S. F.; REXROAD, J.; FROLOV, V. G.; LOOK, J. L.; KONAR, N.; MIDDGAUGH, C. R. Analysis of thermal and pH stability of human respiratory syncytial virus. **Molec. Pharm.** V. 2, 6: 491-499, 2005.

AVENDANO, L. F.; LARRANAGA, C.; PALOMINO, M. A.; GAGGERO, A.; MONTALDO, G.; SUAREZ, M.; DIAZ, A. Community and hospital acquired respiratory syncytial virus infection in Chile. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 10:564, 1991.

AVILA, M.; SALOMON, H.; CARBALLAL, G.; EBKIAN, B.; WOYSKOVSKY, N.; CERQUEIRO, M. C.; WEISSENBACHER, M. Isolation and identification of viral agents in Argentinian children with acute lower respiratory tract infection. **Rev. Infect. Dis.**, 12(8): S974-81, 1990.

BEELER, J. A.; COELING, K.; Neutralization epitopes of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. **J. Virol.** 63: 2941-50, 1989.

BECNEL, D.; YOU, D.; ERSKIN, J.; DIMINA, D. M.; CORMIER, S. A. A role for airway remodeling during respiratory syncytial virus infection. **Respir. Res.** 6: 122, 2005.

BEDOYA, V. I.; ABAD, V.; TRUJILLO, H. Frequency respiratory syncytial virus in hospitalized infants with lower acute respiratory tract infection in Colombia. **Ped. Infect. Dis. J.**, 15: 1123-1124, 1996.

BELÁK, S.; THORÉN, P. Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade. **Expert. Rev. Mol. Diagn.** 1 (4): 434-443, 2001.

BELSHE, R. B.; MUFSON, M. A. Respiratory Syncytial Virus. **In: BELSHE, R. B. Textbook of human virology.** New York: Littleton Psg Publishing., 1072p. p.388-407, 1991.

BELSHE, R. B.; ANDERSON, E. L.; WALSH, E. E. Immunogenicity of purified F Glycoprotein of respiratory syncytial virus: clinical and immune responses to subsequent natural infection in children. **J. Infect. Dis.**, 168: 1024-1029, 1993.

BLANC, A.; DELFRARO, A.; FRABASILE, S.; ARBIZA, J. Genotypes of respiratory syncytial virus group B identified in Uruguay. **Arch. Virol.**, 150: 603-609, 2005.

BOLT, G. Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. **Virus Res.** 68: 25-33, 2000.

BOSSO, P. A. R. **Detecção do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) em Crianças com Infecções Respiratórias Aguda, atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP, Brasil.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2003.

BOTOSSO, V. F. **Detecção rápida do vírus respiratório sincicial em cultura de células pela técnica da imunoperoxidase anti-complemento, utilizando anticorpos monoclonais.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1997.

BOTOSSO, V. F. **Diversidade genética da glicoproteína G do vírus respiratório sincicial humano (HRSV) entre as amostras clínicas isoladas na cidade de São Paulo, 1995-1998.** 104p. Tese de doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2001.

BRANDT, C.; POWER, U. F.; PLOTNICKY GILQUIM, H.; HUSS, T.; NGUYEN, T.; LAMBERT, P. H.; BINZ, H.; SIERGRIST, C. A. Protective immunity against respiratory syncytial virus in early life after murine maternal or neonatal vaccination with the recombinant G fusion protein BBG2Na. **J. Infect. Dis.**, 176: 884-891, 1997.

BROUARD, J.; FREYMUTH, F.; CONSTANTINI, S.; PETITJEAN, J.; SCHREVEL, G.; DUHAMEL, J. F. Prévalence et aspects cliniques de l'infection par les soustypes A et B du virus respiratoire syncytial. Observation de 8 épidémies consecutives de 1982 à 1990. **Arch. Fr. Pédiatr.**, 50: 639-643, 1993.

BROUGHTON, S.; GREENOUGH, A. Effectiveness of drug therapies to treat or prevent respiratory syncytial virus infection-related morbidity. **Expert. Opinion in Pharmacother.**, 4: 1801-8, 2003.

BUKREYEV, A.; WHITEHEAD, S. S.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. **J. Virol.**, 71: 8973-82, 1997.

BUCKINGHAM, S. C.; BUSH, A. J.; DEVINCENZO, J. P. Nasal quantify of respiratory syncytial virus correlates with disease severity in hospitalized infants. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 19(2): 113-117, 2000.

BYINGTON, C. L.; CASTILLO, H.; GERBER, K.; DALY, K.; DALY, J. A.; BRIMLEY, L. A.; ADAMS, S.; CHRISTENSON, J. C.; PAIVA, A. T. The effect of rapid respiratory viral diagnostic testing on antibiotic use in children's hospital. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.** 156:1230, 2002.

CABRERA, ROCA, G.; DOMINGUES ORTEGA, F.; LAFARGA CAPUZ, B.; CALVO ROSALES, J. Estudio clínico epidemiológico de la infección por virus respiratorio sincicial en el lactante. **An. Esp. Pediatr.**, 46: 576-580, 1997.

CALEGARI, T.; QUEIROZ, D. A.; YOKOSAWA, J.; SILVEIRA, H. L.; COSTA, L. F.; OLIVEIRA, T. F.; LUIZ, L. N.; OLIVEIRA, R. C.; DINIZ, F. C.; ROSSI, L. M.; CARVALHO, C. J.; LIMA, A. C.; MANTESE, O. C. Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.** 9(2): 156-61, 2005.

CANDEIAS, J. A. N. Isolamento de vírus respiratório sincicial em crianças com quadro respiratório agudo. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, 9(1): 27-30, 1967.

CANE, P. A.; MATTHEWS, D. A.; PRINGLE, C.R. Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. **J. Clin. Microbiol.** 32: 1-4, 1994.

CANE, P. A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. **Rev. Med. Virol.** 11: 103-16, 2001.

CARTEE, T. L.; WERTZ, G. W.; Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection, **J. Virol.**, 75: 12188-12197, 2001.

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

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

CHRISTENSEN, L. S.; LARSEN, L. B.; JOHANSEN, J.; ANDERSEN, E. A.; WEJSE, C.; KLUG, B.; HORNSLETH, A. The fluctuating pattern of various genome types of respiratory syncytial virus in Copenhagen and some other locations in Denmark. **APMIS.**, 107(9): 843-50, 1999.

CHOI, E. H.; LEE, H. J. Genetic Diversity and molecular epidemiology of the G protein of subgroups A and B of respiratory syncytial virus isolated over 9 consecutive epidemics in Korea. **J. Inf. Disease.**, 181: 1547-56, 2000.

CHAO, R. K.; FISHAUT, M.; SCHAWARTZMAN, J. D.; MCINTOSH, K. Detection of respiratory syncytial virus in nasal secretions from infants by enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Infect. Dis.**, 139(4): 483-486, 1979.

CHENG, X.; PARK, H.; ZHOU, H.; JIN, H. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. **J. Virol.** V.79, 22: 13943-13952, 2005.

CHRISTENSEN, L. S.; LARSEN, L. B.; JOHANSEN, J.; ANDERSEN, E. A.; WEJSE, C.; KLUG, B.; HORNSLETH, A. The fluctuating pattern of various genome types of respiratory syncytial virus in Copenhagen and some other locations in Denmark. **APMIS.**, 107: 843-50, 1999.

CIANCI, C.; MEANWELL, N.; KRYSTAL, M. Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor. **J. Antimicrob. Chemother.**, 55: 289-92, 2005.

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

CLEWLEY, J. P. The polymerase chain reaction, a review of the practical for human immunodeficiency virus diagnosis. **J. Virol. Meth.**, 25: 179-188, 1989.

COATES, H. V.; CHANOCK, R. M. Experimental infection with respiratory syncytial virus in several species of animals. **Am. J. Hyg.**, 76: 302-312, 1962.

COATES, H. V.; KENDRICK, L.; CHANOCK, R. M. Antigenic differences between two strains of respiratory syncytial virus. **Proc. Soc. Biol. Med.**, 112: 958-964, 1963.

COATES, H. V.; ALLING, D. W.; CHANOCK, R. M. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus by plaque reduction neutralization test. **Am. J. Epidemiol.**, 89: 299-233, 1966.

COGGINS, W. B.; LEFKOWITZ, E. J.; SULLENDER, W. M. Genetic variability among group A and B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. **J. Clin. Microbiol.** 36: 3552-3557, 1998.

COIRAS, M; T.; PEREZ-BRENA, P.; GARCÍA, M. L.; CASAS, I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. **J. Virol.** 69: 132-144, 2003.

COLLINS, P. L.; PURCELL, R. H.; LONDON, W. T.; LAWRENCE, L. A.; CHANOCK, R. M.; MURPHY, B. R. Evaluation in chimpanzees of vaccinia virus recombinants that express the surface glycoprotein of human respiratory syncytial virus. **Vaccine**, 8: 164-168, 1990.

COLLINS, P. L.; HILL, M. G.; CRISTINA, J.; GROSFELD, H. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 93: 81-85, 1996.

COLLINS, P. L.; MCINTOSH, K.; CHANOCK, R. M. Respiratory syncytial virus. In B. N. FIELDS (Ed.). **Virology**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. p. 1313-1351, 2001.

COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASE. Use of ribavirin in the treatment of respiratory syncytial virus infection. **Pediatrics**, 92: 501-504, 1993.

COMMITTEE ON INFECTIONS DISEASES AND COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN. Prevention of respiratory syncytial virus infections: indications for the use of palivizumab and update on the use of RSV-IGIV. **Pediatrics**, 102(5): 1211-1216, 1998.

CROWE, J. E. JR.; BUI, P. T.; DAVIS, A. R.; CHANOCK, R. M.; MURPHY, B. R. A further attenuated derivative of a cold-passaged temperature-sensitive mutant of human respiratory syncytial virus retains immunogenicity and protective efficacy against wild-type challenge in seronegative chimpanzees. **Vaccine**, 12: 783-790, 1994.

CROWE, J. E. Respiratory syncytial virus vaccine development. **Vaccine**, 20: S32-37, 2002.

CUESTA, I.; GENG, X.; ASENJO, A.; VILLANUEVA, N. Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is a RNA binding protein. **J. Virol.** 74: 9858-9867, 2000.

D'ELIA, C.; SIQUEIRA, M. M.; PORTES, S. A.; SANT'ANNA, C. C. Respiratory syncytial virus –associated lower respiratory tract infections in hospitalized infants. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 38(1): 7-10, 2005.

De VINCENZO, J. P.; *et al.* Surveillance of clinical isolates of respiratory syncytial virus for palivizumab (Synagis)-resistant mutants. **J. Infect. Dis.**, 190: 975-8, 2004.

DOMINGUEZ, E. A. *et al.* Comparison of rapid diagnostic techniques for respiratory syncytial virus and influenza virus respiratory infections in young children. **J. Clin. Microbiol.** 31(9): 2286-2290, 1993

DUDAS, R. A.; KARRON, R. A. Respiratory Syncytial Virus Vaccines. **Clin. Microbiol. Rev.**, 11: 430-439, 1998.

DURBIN, A. P.; KARRON, R. A. Progress in the development of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. **Clin. Infect. Dis.** 37: 1668-77, 2003.

ENGLUND, J. A.; GLENZEN, W. P. Maternal immunization for the prevention of infection in early infancy. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, 2: 225-231, 1991.

ENGLUND, J. A.; PIEDRA, P. A.; WHIMBEY, E.; Prevention and treatment of respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses in immunocompromised patients. **Am. J. Med.**, 102(3A): 61-70, 1997.

ERIKSSON, B.; HELGSTRAND, E.; JOHANSSON, N. G.; LARSSON, A.; MISIORNY, A.; NOREN, J. O.; PHILIPSON, L.; STENBERG, K.; STENING, G.; STRIDH, S.; OBERG, B. Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. **Antimicrob. Agents Chemother**, 11: 946-915, 1997.

FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. Safety and immunogenicity of respiratory syncytial virus subunit vaccine (PFP-2) in the institutionalized elderly. **Vaccine**, 15: 1130-1132, 1997.

FALSEY, A. R. Respiratory syncytial virus infection in older persons. **Vaccine**, 16(18): 1775-1778, 1998.

FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. Respiratory syncytial virus infection in adults. **Clin. Microbiol. Rev.**, 13(3): 371-384, 2000.

FALSEY, A. R.; FORMICA, M. A.; WALSH, E. E. Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus Infection: Comparison of Reverse Transcriptase-PCR to Viral Culture and Serology in Adults with Respiratory Illness. **J. Clin. Microvirology.**, 40(3): 817-820, 2002.

FAN, J.; HENRICKSON, K. J.; SAVATSKI, L. L. Rapid simultaneous diagnosis of infection with respiratory syncytial viruses A and B, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridisation assay (Hexaplex). **Clin. Infect. Dis.**, 26: 1397-1402, 1998.

FEARNS, R.; COLLINS, P. L. Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. **J. Virol.** 73: 388-397, 1999a.

FEARS, R.; COLLINS, P. L. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. **J. Virol.** 73: 5852-5864, 1999b.

FELDMAN, S. A.; CRIM, R. L.; AUDET, S. A.; BEELER, J. A. Human respiratory syncytial virus surface glycoproteins F, G and SH form an oligomeric complex. **Arch. Virol.** 146: 2369-2383, 2001.

FENG, D. F.; DOOLITTLE, R. F.; Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. **J. Mol. Evol.** 25: 351-360, 1987.

FOSTER, J. *et al.* Prospective population-based study of viral lower respiratory tract infection in children under 3 years of age (the PRI.DE study). **Eur. J. Pediatr.**, 163: 709-716, 2004.

FRABASILE, S.; DELFARO, A.; FACAL, L.; GALIANO, M.; de SIERRA, M. J.; RUCHANSKY, D.; VITUREIRA, N.; BEROIS, M.; CARBALLAL, G.; RUSSI, J.; ARBIZA, J. Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial virus (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. **J. Med. Virol.**, 71:305-312, 2003.

FREYMUTH, F.; VABRET, A.; GALATEAU-SALLE, F.; FERREY, J.; EUGENE, G.; PETIGEAN, J.; GENNETAY, E.; BROUARD, J.; JOKIK, M.; DUHAMEL, J.; GUILLOIS, B. Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza 3, adenovirus and rhinovirus sequence in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. **Clin. Diagn. Virol.**, 8: 31-40, 1997.

FREKE, A.; STOTT, E. J.; ROOME, A. P.; CAUL, E. O. The detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates: assessment, formulation, and evaluation of monoclonal antibodies as a diagnostic reagent. **J. Med. Virol.**, 18(2): 181-191, 1986.

GALIANO, M. C.; LUCHSINGER, V.; VIDELA, M. C.; SOUZA, L. D.; PUCH, S. S.; PALOMO, C.; RICARTE, C.; EBKIAN, B.; AVENDAÑO, L.; CARBALLAL, G. Intragroup antigenic diversity of human respiratory syncytial virus (group A) isolated in Argentina and Chile. **J. Méd. Virol.N.**, 77: 311-316, 2005.

GARCIA, M. L. G.; REY, C. C.; VALLE, M. DEL.; HUERTAS, M. R. L.; FLECHA, I. C.; DIAS-DELEGADO, R.; BENA, P. P. Infecções respiratórias por metapneumovírus em lactantes hospitalizados. **Pediatr.**, 61 (3): 213-218, 2004.

GARDNER, I. A.; GREINER, M. Preface. **Prev. Vet. Med.**, 45(1-2): 1, 2000.

GHILDYAL, R.; MILLS, J.; MURRAY, M.; VARDAXIS, N.; MEANGER, J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. **J. Gen. Virol.** 83: 753-757, 2002.

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

GILBERT, L. L.; DAKHAMA, A.; BONE, B. M.; THOMAS, E. E.; HEGELE, R. G. Diagnosis of viral respiratory syncytial virus tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel. **J. Clin. Microbiol.**, 34(1): 140-143, 1996.

GILCA, R.; SERRES, G. D.; TREMBLAY, M.; VACHON, M. L.; LEBLANC, E.; BERGERON, M. G.; DÈRY, P.; BOIVIN, G. Distribution and clinical impact of human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children over 2 winter seasons. **J. Infect. Dis.**, 193: 54-58, 2006.

GIRARD, P. M.; CHERIAN, T.; KIENY, M. P.; A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. **Vaccine**, 23: 5708-5724, 2005. Review.

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

GOLDMAN, D. A. Epidemiology and prevention of pediatric viral respiratory infections in health-care institutions. **Emerg. Infect. Dis.**, 7: 249-252, 2001.

GOTTSCHALK, J.; ZBINDEN, R. R.; KAEMPF, L.; HEINZER, I. Discrimination of respiratory syncytial virus subgroups A and B by reverse transcription-PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 34(1): 41-43, 1996.

GRÖNDAHL, B.; PUPPER, W.; WEIGL, J.; SCHIMITT, H. J. Comparison of the BD Directigen Flu A + B Kit and the Abbott TestPack RSV with a multiplex RT-PCR ELISA for rapid detection of influenza viruses and respiratory syncytial virus. **Clin. Microbiol. Infect.**, 11: 848-850, 2005.

GROOTHUIS, J. R.; GUTIERREZ, K. M.; LAUER, B. A. Respiratory syncytial virus infection in children with bronchopulmonary dysplasia. **Pediatrics**, 82(2): 199-203, 1988.

GROOTHUIS, J. R.; LEVIN, M. J.; RODRIGUEZ, W.; HALL, C. B.; LONG, C. E.; KIM, H. W.; LAUER, B. A.; HEMMING, V. G.; RSVIG Study Group. Use of intravenous gamma globulin to passively immunize high-risk children against respiratory syncytial virus: safety and pharmacokinetics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 35: 1469-1473, 1991.

GROOTHUIS, J. R. The role of RSV neutralizing antibodies in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection in high-risk children. **Antiviral Res.**, 23: 1-10, 1994.

GROOTHUIS, J. R.; SIMÕES, E. A.; HEMMING, V. G. Respiratory syncytial virus (RSV) infection in preterm infants and the protective effects of RSV immune globulin (RSVIG). RSVIG Study Group. **Pediatrics**, 95: 463-467, 1995.

GROOTHUIS, J. R.; KIGH, S. J.; HOGERMAN, D. A.; PARADISO, P. R.; SIMÕES, E. A. Safety and immunogenicity of a purified F protein respiratory syncytial virus (PFP-2) vaccine in seropositive children with bronchopulmonary dysplasia. **J. Infect. Dis.**, 177: 467-469, 1998.

GUEUDIN, M.; VABRET, A.; PETIJEAN, J.; GOUARIN, S.; BROUARD, J.; FREYMUTH, F. Quantification of respiratory syncytial virus RNA in nasal aspirates of children by real-time RT-PCR assay. **J. Virol. Meth.** 109: 39-45, 2003.

HALLAK, L. K.; COLLINS, P. L.; KNUDSON, W.; PEEPLES, M. E. Iduronic acid containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. **Virology**. 271: 264-275, 2000a.

HALLAK, L. K.; SPILLMANN, D.; COLLINS, P. L. PEEPLES, M. E. Glycosaminoglycan sulfation requirements for syncytial respiratory virus infection. **J. Virol.**, 74: 10508-10513, 2000b.

HALL, C. B.; DOUGLAS, R. G.; GEINAM, J. M. Nosocomial respiratory syncytial virus infections. **N. Engl. J. Med.**, 293(26): 1343-1346, 1975.

HALL, C. B.; DOUGLAS, Jr. R. G.; GEIMAN, J. M.; Quantitative shedding patterns of respiratory syncytial virus in infants. **J. Infect. Dis.** 2: 151-156, 1975b.

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

HALL, C. B.; WALSH, E. E.; LONG, C. E.; SCHNABEL, K. C. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. **J. Infect. Dis.**, 163: 693-698, 1991.

HALL, C. B. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. **N. Engl. J. Med.** 344: 1917-1928, 2001

HAKHVERDYAN, M.; HÄGGLUND, S.; LARSEN, L.; BELÁK, S. Evaluation of a single-tube fluorogenic RT-PCR assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. **J. Virol. Methods**, 123: 195-202, 2004.

HAN, L. L.; ALEXANDER, J. P.; ANDERSON, L. J. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. **J. infect. Dis.**, 179: 25-30, 1999.

HARDY, R. W.; HARMON, S. B.; WERTZ, G. W. Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. **J. Virol.** 73: 170-176, 1999.

HARDY, R. W.; WERTZ, G. W. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. **J. Virol.** 72: 520-526, 1998.

HARRINGTON, R. D.; *et al.* An outbreak of respiratory syncytial virus infection in a bone marrow transplant center. **J. Infect. Dis.**, 6: 987-993, 1992.

HAYDEN, F. G. Combination antiviral therapy for respiratory virus infections. **Antiviral Res.**, 29: 45-48, 1996.

HEIN, N. **Aspectos epidemiológicos da infecção por vírus respiratórios em crianças internadas.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo São Paulo, 1997.

HEMMING, V. G.; RODRIGUEZ, W.; KIM, H. W.; BRANDT, C. D.; PARROT, R. H.; BURCH, B.; PRINCE, G. A.; BARON, P. A.; FINK, R. J.; REAMAN, G. Intravenous immunoglobulin treatment of respiratory syncytial virus infections in infants and young children. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 31: 1882-1886, 1987.

HENDERSON, F. W.; COLLIER, A. M.; CLYDE, W. A. Jr.; DENNY, F. W. Respiratory syncytial-virus infections, reinfections and immunity: a prospective, longitudinal study in young children. **N. Engl. J. Med.**, 300: 530-4, 1979.

HENDRY, R. M.; TALIS, A. L.; GODFREY, E.; ANDERSON, L. J.; FERNIE, B. F.; MCINTOSH, K. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. **J. Infect. Dis.**, 153: 291-297, 1986.

HENDRY, R. M.; BURNS, J. C.; WALSH, E. E.; WRIGGT, P. F.; HEMMING, V. G.; RODRIGUEZ, W. J.; KIM, H. W.; PRINCE, G. A.; MCINTOSH, K. Strain-specific serum antibody responses in infants undergoing primary infection with respiratory syncytial virus. **J. Infect. Dis.**, 157: 640-7, 1988.

HENKEL, J. H.; ABERLE, S. W.; KUNDI, M.; POPOW-KRAUPP, T. Improved detection of respiratory syncytial virus in nasal aspirates by seminested RT-PCR. **J. Med. Virol.**, 53: 366-71, 1997.

HERRMANN, *et al.* Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by Nested Reverse Transcription-PCR; Comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). **J. Clin. Microbio.** 39: 134-138, 2001.

HIERHOLZER, J. C.; CASTELLS, E.; BANKS, G.; BRYAN, J.; MCEWEN, C. Sensitivity of NCI-H292 human lung mucoepidermoid cells for respiratory and other human viruses. **J. Clin. Microbiol.**, 31(6): 1504-1510, 1993.

HITE, S. A.; HUANG, V. T. Microwave-accelerated direct immunofluorescent staining for respiratory syncytial virus and influenza A virus. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 1819-20, July, 1996.

HOMA, F. L.; BRIDEAU, R. J.; LEHMAN, D. J.; THOMSEN, D. R.; OLMSTED, R. A.; WATHEN, M. W. Development of a novel subunit vaccine that protects cotton rats against both human respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type-3. **Gen. Virol.**, 74, 1999.

HORNSLETH, A.; KLUG, B.; NIR, M.; JONHANSEN, J.; HANSEN, K. S.; CHISTENSEN, L. S.; LARSEN, L. B. Severity of respiratory syncytial virus disease related to type and genotype of virus and to cytokine values in nasopharyngeal secretions. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 17: 1114-1121, 1998.

HU, A.; COLELLA, M.; TAM, J. S.; RAPPAPORT, R.; CHENG, S. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 41: 149-154, 2003.

HUANG, Y. T.; WERTZ, G. W. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. **J. Virol.**, 43(1): 150-157, 1982.

IMAZ, M. S.; SEQUEIRA, M. D.; VIDELA, C.; VERONESSI, I.; COCIGLIO, R.; ZERBINI, E.; CARBALLAL, G. Clinical and epidemiological characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fé, Argentina. **J. Med. Virol.**, 61: 76-80, 2000.

ISON, M. G.; HAYDEN, F. G. Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses? **Curr. Opin. Infect. Dis.** 15:355-367, 2002

JOHNSON, P. R.; SPRIGGS, M. K.; OLMSTED, R. A.; COLLINS, P. L. The glycoprotein of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: Extensive sequence divergence between antigenically related proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 84: 5625-29, 1987.

KAMASAKI, H.; TSUTSUMI, H.; SEKI, K.; CHIBA, S. Genetic variability of respiratory syncytial virus subgroup B strain isolated during the last 20 years from the same region in Japan: existence of time-dependent linear genetic drifts. **Arch. Virol.** 146: 457-466, 2000.

KARRON, R. A.; BUONAGURIO, D. A.; GEORGIU, A. F.; WHITEHEAD, S. S.; ADAMUS, J. E.; CLEMENTS-MANN, M. L.; HARRIS, D. O.; RANDOLPH, V. B.; UDEM, S. A.; MURPHY, B. R.; SIDHU, M. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for replication *in vitro*: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passage, attenuated RSV subgroup B mutant. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94: 13961-966, 1997.

KARRON, R. A.; Respiratory syncytial virus vaccine. In PROTGIN S. A, ORENSTEIN W. A. (Ed.). **Vaccines.** 4th ed. USA: Elsevier, 1317-26, 2004.

KARRON, A. R.; WRIGHT, P. F.; BELSHE, R. B.; THUMAR, B.; CASEY, R.; NWEAMAN, F.; POLACK, P. F.; RANDOLPH, V. B.; DEATLY, A.; HACKELL, J.; GRUBER, W.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. L. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. **J. Infect. Dis.** 191: 1093-104, 2005.

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

KELLOG, J. A. Culture vs direct antigen assay for detection of microbial pathogens from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 115: 451-458, 1991.

KINGSBURY, D. W.; *Paramyxoviridae* and their replication. In: FIELDS, B. N. **Virology**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. p. 945-962, 1990.

KRAMER, M. S.; FEINSTEIN, A. R. Clinical Biostatistics. LIV. The biostatistics of concordance. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 29(1): 111-123, 1981.

KRUSAT, T.; STRECKERT, H. J. Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. **Arch. Virol.**, 142(6): 1247-1254, 1997.

KUYPERS, J.; WRIGHT, N.; MARROW, R. Evaluation of quantitative and type-specific real-time RT-PCR assays for detection of respiratory syncytial virus in respiratory specimens from children. **J. Clin. Virol.**, 31: 123-129, 2004.

KUROIWA, Y.; NAGAI, K.; OKITA, L.; UKAE, S.; Mori, T. Comparison of an Immunochromatography Test with Multiplex Reverse Transcriptase-PCR for Rapid Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus Infections. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 4812-4814, 2004.

LADWIG-TERLETSKAIA, E.; ENDERS, G., SCHALASTA, G.; ENDERS, M. Defining the timing of respiratory syncytial virus (RSV) outbreaks: an epidemiological study. **BMC Infectious Diseases**, 5:20, 2005.

LEAL, A. L. Associação Clínico – **Laboratorial de Infecções Causadas por Vírus Respiratórios com Idade Inferior a 05 Anos Atendidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2005.

LEVINE, S.; KLAIBER-FRANCO, R.; PARADISO, P. R. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. **J. Gen. Virol.**, V.68, N.9, p.2521-2524, 1987.

LICHTENSTEIN, D. L.; ROBERTS, S. R.; WERTA, G. W.; BALL, A. Definition and functional analysis of the signal/anchor domain of the human respiratory syncytial virus glycoprotein G. **J. Gen. Virol.** 77: 109-8, 1996.

LICHTENSTEIN, D. L.; ROBERTS, S. R.; WERTA, G. W.; BALL, A. Definition and functional analysis of the signal/anchor domain of the human respiratory syncytial virus glycoprotein G. **J. Gen. Virol.** 77: 109-8, 1996.

LUKIC-GRLIC, A.; CANE, P. A.; BACE, A.; PRINGLE, C. R.; MLINARIC-GALINOVIC, G.; POPOW-KRAUPP, Th. Antigenic and genomic diversity of central European respiratory syncytial virus strains. **Arch. Virol.**, 143: 1441-1447, 1998.

MACKIE, P. L. K.; GETTY, S.; PATON, J. Y. Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus by using pernasal swabs. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 2653-5, 1991.

MALHOTRA, R.; WARD, M.; BRIGHT, H.; PRIEST, R.; FOSTER, M. R.; HURLE, M.; BLAIR, E.; BIRD, M. Isolation and characterization of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. **Mic. Infect.**, 5: 123-133, 2003.

MARTINEZ, I.; VALDES, O.; DELFRARO, A.; ARBIZA, J.; RUSSI, J.; MELERO, J. A. Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B: the use of alternative termination codons and lineage diversification. **J. Gen. Virol.** 80: 125-130, 1999.

MARTINEZ, I.; MELERO, J. A. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sialinated cell surface proteoglycans. **J. Virol.**, 81: 2715-2722, 2000.

MASTERS, H. B.; WEBER, K. O.; GROOTHUIS, J. R.; WREN, C. G.; LAUER, B. A. Comparison of nasopharyngeal washing and swabs specimens for diagnosis of respiratory syncytial virus by EIA, FAT and Cell culture. **Diagn. Microbial. Dis.**, 8: 101-5, 1987.

MATTHEWS, J. M.; YOUNG, T. F.; TUCKER, S. P.; MACKAY, J. P. The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil. **J. Virol.** 74: 5911-5920, 2000.

MCCONNOCHIE, K. M.; HALL, C. B.; WALSH, E. E.; ROGHMANN, K. J. Variation in severity of respiratory syncytial virus infection with subtype. **J. Pediatr.**, 117: 52-62, 1990.

MCDONALD, N. E.; HALL, C. B.; SUFFIN, S. C.; ALEXSON, C.; HARRIS, P. J.; MANNING, J. A. Respiratory syncytial virus infection in infants with congenital heart disease. **N. Engl. J. Med.**, 307: 397-400, 1982.

MCINTOSH, E. D.; SILVA, L. M.; OATES, R. K. Clinical severity of respiratory syncytial virus group A and B infection in Sidney, Australia. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 12(10): 815-819, 1993.

McKIMM-BRESCHKIN, J. ViroFarma. **Curr. Opin. Investig. Drugs.**, 1(4): 425-7, 2000.

MEISSNER, H. C.; FULTON, D. R.; GROOTHUIS, J. R.; GEGGEL, R. L.; MARX, G. R.; HEMMING, V.G.;HOUGEN, T.; SNYDMAN, D. R. Controlled trial to evaluate protection of high-risk infants against respiratory syncytial virus disease by using standard intravenous immune globulin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 37: 1655-1658, 1993.

MEJÍAS, A.; CHÁVEZ-BUENO, S.; RÍOS, A. M.; ATEN, M. F.; RAYNOR, B. R.; PEROMINGO, E.; SONI, P.; OLSEN, K. D.; KIENER, P. A.; GÓMEZ, A. M.; JAFRI, H. S.; RAMILO, O. Comparative effects of two neutralizing anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibodies in the RSV murine model: time versus potency. **Antimicrob. Agents and Chemoteraphy.**, 49: 4700-4707, 2005.

MELERO, J. A.; GARCIA-BARRENO, B.; MARTINEZ, I.; PRINGLE, C. R.; CANE. P. Antigenic Structure, evolution and immunobiology of juman respiratory syncytial virus attachment (G) protein. **J. Gen. Virol.**, 78: 2411-18, 1997.

METEYARD, J. D.; YOUNG, P. R. Optimization of PCR and automated sequencing of clinical isolates of respiratory syncytial virus. **J. Virol. Methods**, 50: 335-342, 1994.

MILLER, H.; MILK, R. AND DIAZ-MITOMA, F. Comparison of the VIDAS RSV assay and abbott testpack RSV with direct immunofluorescence for detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. **J. Clin. Microbial.**, 31: 1336-1338, 1993.

MIYAO, C. R.; GILIO, A. E.; VIEIRA, S.; HEIN, N.; PAHL, M. M. C.; BETTA, S. L.; DURIGON, E. L.; STEWIEN, K. E.; QUEIROZ, D. A. O.; BOTOSSO, V. F.; GOMES, M. C. S.; LOPES, C. L. B. C.; EJZEMBERG, B.; OKAY, Y. Infecções Virais em crianças internadas por doença respiratória aguda do trato respiratório inferior. **J. Pediatr.** 75: 334-344, 1999.

MOURA, F. E.; BORGES, L. C.; PORTES, S. A.; RAMOS, E. A.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory Syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description o clinical. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 98(6): 739-43, 2003.

MOURA, F. E.; NUNES, I. F.; SILVA, G. B. Jr.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory syncytial virus infection in northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 74(1): 165-7, 2006.

MORRIS, J. R.; BLOUNT, R. E.; SAVAGE, R.E. – Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Coriza. **Proc. Soc. Exp. Med.**, 92: 544-550, 1956.

MOYA, A.; ELENA, S. F.; BRACHO, A.; MIRALLES, R.; BARRIO, E. The evolution of RNA viruses: a population genetics view. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 97: 6967-6973, 2000.

MUFSON, M. A.; ORVELL, C.; RAFNAR, B.; NORRBY, E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **J. Gen. Virol.** 10: 2111-2124, 1985.

MULLINS, J. A.; ERDMAN, D. D.; WEINBERG, G. A.; EDWARDS, K.; HALL, C. B.; WALKER, F. J.; IWANE, M.; ANDERSON, L. J. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. **Emer. Infect. Dis.**, 10: 700-705, 2004.

NAGAI, K.; KAMASAKI, H.; KUROIWA, Y. OKITA, L.; TSUTSUMI, H. Nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus subgroup B variants with the 60 nucleotides-duplicated G protein gene. **J. Med. Virol.** 74: 161-5, 2004.

NASCIMENTO, J. P.; SIQUEIRA, M. M.; SUTMOLLER, F. Longitudinal study of acute respiratory disease in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Rev. Inst. Med. São Paulo**, v. 3, p. 287-296, 1991.

OGRA, P. L. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. **Pediatr.** S119-S126, 2004. Suppl A. Review.

OIEN, N. L.; BRIDEAU.; WALSH, E. E.; WATHEN, M. W. Induction of local and systemic immunity against human respiratory syncytial virus using a chimeric FG glycoprotein and cholera toxin B subunit. **Vaccine**, 12: 731-735, 1994.

OHN-SMITH, M. J.; NASSOS, P. S.; HALLER, B. L. Evaluation of the Binax NOW, BD Directigen, and BD Directigen EZ Assays for Detection of Respiratory Syncytial Virus. **J. Clin. Microbiol.** 42:2996-2999, 2004.

ONG, G. M.; WYATT, D. E.; O'NEILL, H. J.; MCCAUGHEY, C.; COYLE, P. V. A comparison of nested polymerase chain reaction and reaction immunofluorescence for the diagnosis of respiratory infections in children with bronchiolitis, and the implication for a cohorting strategy. **J. Hosp. Infect.** 49: 122-8, 2001.

OTTOLINI, M. G.; HEMMING, V. G. Prevention and treatment recommendations for respiratory syncytial virus infection – background and clinical experience 40 years after discover. **Drugs**, 54: 867-884, 1997.

PARROT, R. H.; *et al.* Epidemiology syncytial respiratory virus infection in Washington, D. C. II. Infection and diseases with respect to age, immunologic status, race, and sex. **Am. J. Epidemiol.**, 4: 289-300, 1973.

PERET, T. C. T.; HALL, C. B.; SCHNABEL, K. C.; GOLUB, J. A.; ANDERSON, L. J. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. **J. Gen. Virol.**, 79: 2221-2229, 1998.

PERET, T. C. T.; HALL, C. B.; HAMMOND, G. W.; PIEDRA, P. A.; STORCH, G. A.; SULLENDER, W. M.; TSOU, C.; ANDERSON, L. J. Circulation patterns of groups A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. **J. Infect. Dis.**, 181: 1891-1896, 2000.

PIEDRA, P. A.; GRACE, S.; JEWELL, A.; SPINELLI, S.; HOGERMAN, D. A.; MALINOSKI, F. Sequential annual administration of purified fusion protein vaccine against respiratory syncytial virus in children with cystic fibrosis. **Pediatric. Infect. Dis.** 17: 217-24, 1998.

PIEDRA, P. A.; GRACE, S.; JEWELL, A.; SPINELLI, S.; BUNTING, D.; HOGERMAN, D. A.; MALINOSKI, F.; HIATT, P. W. Purified fusion protein vaccine protects against lower respiratory tract illness during respiratory syncytial virus season in children with cystic fibrosis. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 15: 23-31, 1996.

PIROFSKI, L. A.; CASADEVALL, A. Use of licensed vaccines for active immunization of the immunocompromised host. **Clin. Micro. Rev.**, 11: 1-10, 1998.

PITKÄRANTA, A.; JERO, J.; ARRUDA, E.; VIROLAINEN, A.; HAYDEN, F. G. Polymerase chain rection-based detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus in otitis media with effusion. **J. Pediatr.**, 133(3): 390-394, 1998a.

PITKÄRANTA, A.; VIROLAINEN, A.; JERO, J.; ARRUDA, E.; HAYDEN, F. G. Detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus infections in acute otitis media by reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Pediatrics**, 102(2): 291-295, 1998b.

POLACK, F. P. *et al.*, A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. **J. Exp. Med.**, 196: 859-65, 2002.

POLACK, F. P.; KARRON, R. A. The future of respiratory syncytial virus development. **Pediatric. Infect. Dis.** 23: S65-S73, 2004.

PREVENT STUDY GROUP. Reduction of respiratory syncytial virus hospitalization among premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia using respiratory syncytial virus immune globulin prophylaxis. **Pediatrics**, 99: 93-99, 1997.

QUEIROZ, D. A.; *et al.* Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. **Br. J. Med. Biol. Res.**, 35: 1183-1193, 2002.

RANDOLPH, V. B.; KANDIS, M.; STEMLER-HIGGINS, P.; KENNELLY, M. S.; MCMULLEN, Y. M.; SPEELMAN, D. J.; WEEKS-LEVY, C. Attenuated temperature-sensitive respiratory syncytial virus mutants generated by cold adaptation. **Virus Res.**, 33: 241-259, 1994.

REED, L. J.; MUENCH, H. **Amer. J. Hyg.** 27: 493, 1938.

REINA, J.; GONZALES, G.; GOPEGUI, E. R.; PADILLA, E.; BALLESTEROS, F.; MARI, M.; MUNAR, M. Prospective evaluation of a dot-blot enzyme immunoassay (directigen RSV) for the antigenic detection of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates of paediatric patients. **Clin. Microbiol. Infect.**, 10: 967-971, 2004.

RIBES, J. A.; SEABOLT, J. P.; OVERMAN, S. B. Performance characteristics of VIDAS and Directigen respiratory syncytial virus (RSV) antigen detection assay and culture for the identification of RSV in respiratory specimens. **J. Clin. Microbiol.** 40: 1818-1820, 2002.

RIXON, H. W. M.; BROWN, G.; SUGRUE, R. J. Multiple glycosylated forms of the respiratory syncytial virus fusion protein are expressed in virus-infected cell. **J. Gen. Virol.** 83: 61-66, 2002.

RIXON, H. W. M.; BROWN, G.; AITKEN, J.; McDONALD, T.; GRAHAM, S.; SUGRUE, R. J. The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. **J. Gen. Virol.** 85: 1153-1165, 2004.

ROVIDA, F.; PERCIVALLE, E.; ZAVATTONI, M.; TORSELLINI, M.; SARASINI, A.; CAMPANINI, G.; PAOLUCCI, S.; BALDANTI, M.; REVELLO, M. G.; GERNA, G. Monoclonal antibodies versus reverse transcription-PCR for detection of respiratory viruses in a patient population with respiratory tract infections admitted to hospital. **J. Med. Virol.**, 75: 336-347, 2005.

RUSSI, J. C.; Chiaparelli, H.; Montano, A.; Etorena, P.; Hortal, M. Respiratory syncytial virus subgroups and pneumonia in children. **Lancet**, 2: 1039-1040, 1989a.

RUSSI, J. C.; *et al.* Antigenic characterization of respiratory syncytial virus associated with acute respiratory infections in Uruguayan children from 1985 to 1987. **J. Clin. Microbiol.**, 27: 1464-1466, 1989b.

RUUSKANEN, O.; OGRA, P. L. Respiratory syncytial virus. **Curr. Probl. Pediatr.** 23: 50-79, 1993.

RYBICKI, E. **Electronic version of introduction o molecular virology** – Baltimore Classification of viruses. Disponível em: <http://www.bocklabs.wisc.edu/ed/genomes.html>, acessado em 11 abr. 2001).

SARKKINEN, H. K.; HALONEN, P. E.; ARSTILA, P. P.; SALMI, A. A. Detection of respiratory syncytial, parainfluenza type 2, and adenovirus antigens by radioimmunoassay and enzymeimmunoassay antigens by specimens from children with acute respiratory disease. **J. Clin. Microbiol.**, 13(2): 258-265, 1981.

SASTRE, P.; MELERO, J. A.; BARRENO-GARCÍA, B.; PALOMO, CONCEPCIÓN. Comparison of antibodies directed against human respiratory syncytial virus antigens present in two commercial preparations of human immunoglobulins with different neutralizing activities. **Vaccine**, 23: 435-443, 2004.

SATO, M.; SAITO, R.; SAKAI, T.; SANO, Y.; NISHIKAWA, M.; SASAKI, A. SHOBUGAWA, Y.; GEJYO, F.; SUZUKI, H. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections in children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. **J. Clin. Microbiol.** 43: 36-40, 2004.

SCHMIDT, A. C.; COUCH, R. B.; GALASSO, G. J.; HAYDEN, F. G.; MILLS, J.; MURPHY, B. R.; Chanock, R. M. Current research on respiratory viral infections: Third International Symposium. **Antivir. Res.**, 50(3): 157-196, 2001.

SCHMIDT, A. C.; McAULIFFE, J. M.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. L. Recombinant bovine/human parainfluenza virus type 3 (B/HPIV3) expressing the respiratory syncytial virus (RSV) G and F proteins can be used to achieve simultaneous mucosal immunization against RSV and HPIV3. **J. Virol.**, 75(10): 4594-603, 2001.

SERAFINO, R. L.; GURGEL, R. Q.; DOVE, W.; HART, C. A.; CUEVAS, L. E. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus in children over two seasons with a high incidence of respiratory infections in Brazil. **Ann. Trop. Paediatr.** 24(3): 213-7, 2004.

SIMÕES, E. A. F.; SONDHEIMER, H. M.; MEISSNER, H. C. Respiratory syncytial virus immunoglobulin as prophylaxis against respiratory syncytial virus in children with congenital heart disease (abstract). **Pediatr. Res.**, 39: 113A, 1996.

SIMÕES, E. A.; CARBONELL-ESTRANY, X.; KIMPEN, J.; RIEGER, C. H. L. MORRIS, D.; POLLACK, P. F.; GROOTHUIS, J. R. **European Respiratory Society Annual Congress**, 14th, 2004, abstr. 1349.

SCOTT, P. D.; *et al.* Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. **J. Med. Virol.**, 74: 344-345, 2004.

SCOTT, P. D.; OCHOLA, R.; NGAMA, M.; OKIRO, E. A.; NOKES, D. J.; MEDLEY, G. F.; CANE, P. A. Molecular analysis of respiratory syncytial virus reinfection in infants from Coastal Kenya. **J. Infect. Dis.**, 193: 59-67, 2006

SIGURS, N.; BJARNASON, R.; SIGURBERGSSON, F.; KJELLMAN, B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 161: 1501-7, 2000

SIGURS, N.; GUSTAFSSON, P. M.; BJARNASON, R. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 171: 137-41, 2005.

SLINGER, R.; MILK, R.; GABOURY, I.; DIAZ-MITOMA, F. Evaluation of the QuickLab RSV Test, a new rapid lateral-flow immunoassay for detection of respiratory syncytial virus antigen. **J. Clin. Microbiol.** 42: 3731-3733, 2004.

STRALIOTTO, S. M.; ROITMAN, B.; LIMA, J. B.; FISHER, G. B.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis: comparative study of RSV groups A and B infected children. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 27 (1): 1-4, 1994.

SUGRUE, R. L. Furin cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is not requirement for its transport to the surface of virus-infected cell. **J. Gen. Virol.** 82: 1375-1386, 2001,

SULLENDER, W. M.; MUFSON, M. A.; PRINCE, G. A.; ANDERSON, L. J.; WERTZ, G. W. Antigenic and genetic diversity among the attachment proteins of group A respiratory syncytial viruses that have caused repeat infections in children. **J. Infect. Dis.**, 178:925-32, 1998.

SULLENDER, W. M. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. **Clin. Microbiol. Rev.** 13: 1-15, 2000.

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

STEIN, R. T.; SHERRIL, D.; MORGAN, W. J. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. **Lancet**. 354: 541-5, 1999.

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

TANG, R. S.; NGUYEN, N.; CHENG, X.; JIN, H. Requirement of cysteines and length of the human respiratory syncytial virus M2-1 protein for protein function and virus viability. **J. Virol.** 75: 11328-11335, 2001.

TAYLOR, G.; STOTT, E. B. J.; BEW, M. Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice. **Immunology**, 52: 137-42, 1984.

TAYLOR, C. E.; MORROW, S.; SCOTT, M.; YOUNG, B.; TOMS, G. J. Comparative virulence of respiratory syncytial virus subgroups A and B. **Lancet**, 1: 777-778, 1989.

TECHAARPORNKUL, S.; BARRETTO, N.; PEEPLES, M. E.; Functional analysis if recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or glycoprotein gene. **J. Virol.** 75: 6825-6834, 2001.

THE IMPACT RSV STUDY GROUP. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. **Pediatrics**, 102(3): 531-537, 1998.

THOMAZELLI, L. M. **Vigilância epidemiológica de vírus respiratórios humanos am amostras clínicas pela técnica de GeneScan-RT-PCR**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TRENTA, A.; GALIANO, M.; VIDELA, C.; CARBALLAL, G.; GARCIA-BUENO, B.; MELERO, J. A.; PALOMO, C. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 pb nucleotides. **J. Gen. Virol.** 84: 3115-3120, 2003.

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

TRISTAM, D. A.; WELLIVER, R. C. Respiratory syncytial virus. In **Diagnostic**. Procedure for viral, rickettsial and chlamydial infections. 7th ed. American Public Health Association, 1996.

TURNER, R. B. Nosocomial viral respiratory infections in: Pediatric Patients. In **Mayhall, C. G.** Ed. Hospital Epidemiology and Infection control, p. 485-93, 1996.

VALDIVIA, A.; SAVÓN, C.; CHACÓN, D.; SARMIENTO, L.; MORIER, L.; OTERO, A.; SOTO, Y.; OROPESA, S.; GOYENECHEA, A. Analysis of respiratory syncytial virus in clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction restriction mapping. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 92(3): 389-393, 1997.

Van ELDEN, L. J. R.; van LOON, A. M.; van der BEEK, A.; HENDRIKSEN, K. A. W.; HOEPELMAN, A. I. M.; van KRAAIJ, M. G. J.; SCHIPPER, P.; NIJHUIS, M. Applicability of Real-Time Quantitative PCR Assays for Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus Infection in Immunocompromised Adults. **J. Clin. Microbiol.** 41(9): 4378-4381, 2003.

van REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M. ; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus Taxonomy**: Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. Academic Press. 2000, p. 525-59.

VENTER, M.; MADHI, S. A.; TIEMESSEN, C. T.; SCHOUB, B. D. Genetic and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. **J. Gen. Virol.**, 82: 2117-24, 2001.

VENTRE, K.; RANDOLPH, A. **Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children**. Cochrane Database Syst. Cochrane Database Syst., 2004. CD: Ev. 4: CD000181.

VIEGAS, M.; MISTCHENKO, A, S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup A over a six-year period (1999-2004) in Argentina. **J. Med Virol.**, 77:302-310, 2005.

VIEIRA, S. E.; STEWIEN, K. E.; QUEIROZ, D. A. O.; DURIGON, E. L.; TÖRÖK, T. J.; ANDERSON, L. J.; MIYAO, C. R.; HEIN, N.; BOTOSSO, V. F.; PAHL, M. M.; GILIO, A. E.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 43(3): 125-131, 2001.

WALSH, E. E.; FALSEY, A. R.; SWINBURNE, I. A.; FORMICA, M. A. Reverse Transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for diagnosis of respiratory infection in adults: Use of Single-Tube "Hanging Droplet" Nested PCR. **J. Med Virol.**, 63: 259-63, 2001.

WRIGHT, P. F.; *et al.* Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. **J. Infect. Dis.** 182: 1331-42, 2000.

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

WARIS, M. Detection and antigenic variation of respiratory syncytial virus. **Annales Universitatis Turkuensis**, A II. 79, 86 p., 1992.

WEBER, M. W.; MULHOLLAND, E. K.; GREENWOOD, B. M.; respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. **Trop. Med. Int. Health.**, 3: 268-80, 1998.

WEINBERG, G. A. D.; ERDMAN, K. M.; EDWARDS, C. B.; HALL, F. J.; WALKER, M. R.; GRIFFIN, B.; SCHWARTZ. THE BEW VACCINE SURVILLANCE NETWORK STUDY GROUP. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. **J. Infect. Dis.** 189: 706-710, 2004.

WERTZ, G. W.; COLLINS, P. L.; HUANG, Y.; GRUBER, C.; LEVIN, S. Nucleotide, Sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82: 4075-79, 1985.

WHELEN, A. C.; FELMEE, T. A.; HUNT, J. M.; WILLIAMS, D. L.; ROBERTS, G. D.; STOCKMAN L.; PERSING D. H. Direct genotype detection of Mycobacterium tuberculosis rifampin resistance in clinical specimens by using single-tube hemi-nested PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 556-561, 1995.

WHIMBEY, E.; ENGLUND, J. A.; COUCH, R. B. Community respiratory virus infections in immunocompromised patients with cancer. **Am. J. Med.**, 102: 10-8, 1997.

WHITE, L. J.; WARIS, M.; CANE, P. A.; NOKES, D. J.; MEDLEY, G. F. The transmission dynamics of groups A and B human respiratory syncytial virus (hRSV) in England; Wales and Finland: seasonality and cross-protection. **Epidemiol.**, 233: 279-89, 2005

WILLIAMS, J. V.; HARRIS, P. A.; TOLLEFSON, S. J.; HALBURNT-RUSH, L. L.; PINGSTERHAUS, J. M.; EDWARDS, K. M.; WRIGHT, P. F.; CROWE, J. E. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise health infants and children. **New Engl. J. Med.** 350: 443-450, 2004.

WRAY, S. K.; GILBERT, B. E.; NOALL, M. W.; KNIGHT, V. Mode of action of ribavirin: effect of nucleotide pool alterations on influenza virus ribonucleoprotein synthesis. **Antiviral Res.**, 5: 29-37, 1985a.

WRAY, S. K.; GILBERT, B. E.; KNIGHT, V. Effect of ribavirin triphosphate on *primer* generation and elongation during influenza virus trasncription *in vitro*. **Antiviral Res.**, 5: 39-48, 1985b.

WU, H.; *et al.* Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. **J. Mol. Biol.**, 2005.

WYDE, P. R. Respiratory syncytial virus (RSV) disease and prospects for its control. Mini-Review . **Antivir. Res.**, 39: 63-79, 1998.

WYDE, P. R.; *et al.* Short duration aerosols of JNJ 2408068 (R170591) administered prophylactically of therapeutically protect cotton rats from experimental respiratory syncytial virus infection. **Antiv Res.**, 60: 221-31, 2003.

YOURNO, J. A method for *nested* PCR with single closed reaction tubes. **PCR Methods Appl.** 2: 60-65, 1992.

ZLATEVA, K. T.; LEMEY, P.; VANDAMME, A. M.; VAN RANST, M. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup A: Positively selected sites in the attachment G glycoprotein. **J. Virol.** 78: 4675-4683, 2004.

ZLATEVA, K. T.; LEMEY, F.; MÖES, E.; VANDAMME, A.; RANST, M. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. **Am. Soc. Microbiol.** 79(14): 9157-9167, 2005.

ZELAYA, E. A. C.; PETTERSON, C. A.; FORSGREN, M.; ORVELL, C; STRANNEGARD, O. Respiratory syncytial virus infection in hospitalized patients and healthy children in El Salvador. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, 51 (5): 577-584, 1994.

ZHENG, H.; PERET, T. C. T.; RANDOLPH, V. B.; CROWLEY, J. C.; ANDERSON, L. J. Strain-specific reverse transcriptase PCR assay: Means to distinguish candidate vaccine from wild-type strain of respiratory syncytial virus. **J. Clin. Microbiol.**, 34(2): 334-337, 1996.

ANEXO 1: Termo de consentimento pós-informado

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: **Deteção do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) pela RT-PCR em tubo único, em amostras clínicas**

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

Eu , RG
..... , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) nascido(a) em ____ / ____ / ____ , seja voluntário do estudo “**Deteção do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) pela RT-PCR em tubo único, em amostras clínicas**”, esclareço que obtive todas informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que possam descobrir as possíveis causas da doença denominada “**Doenças Respiratórias**” (explicar o que significa os termos científicos).
- II) Serão feitas duas coletas de aspirado de nasofaringe do(a) meu(minha) filho(a);
- III) Essas coletas serão realizadas apenas para estudos e em nada influenciará no tratamento de meu (minha) filho(a); não vai curá-lo (a); mas não causará nenhum problema;

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

São Paulo, ____ de _____ de 2005.

☐ Paciente / ☐ Responsável

.....

Testemunha 1 : _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____
Nome / RG / Telefone

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

ANEXO 2 Titulação das amostras virais padrão na cultura de células para cálculo da dose infectante em cultura de tecidos 50.

Diluições múltiplas de 10, após 72 horas na inoculação.

HRSV-A

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	<i>cn</i>
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
G	+	+	+	-	-	+		-	-	-	-
H	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-

HRSV-B

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	<i>cn</i>
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
E	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

ANEXO 3 Tabela de Preços

Nº	Produto*	Preço ~ R\$ **	Imunofluorescência Indireta - IFI		RT semi Nested PCR		RT-PCR em tubo único	
			Quantidade	Preço	Quantidade	Preço	Quantidade	Preço
01	Ponteira com filtro barreira 10µL - un	0,21	=====	=====	30	6,30	10	2,10
02	Ponteira com filtro barreira 20µL - un	0,21	=====	=====	15	3,15	5	1,05
03	Ponteira com filtro barreira 100µL - un	0,21	=====	=====	6	1,26	2	0,42
04	Ponteira sem filtro 10 µL - un	0,04	12	0,48	=====	=====	=====	=====
05	Microtubo PCR 0,2 mL c/ tampa "flat cap" - un	0,14	=====	=====	3	0,42	1	0,14
06	Tubo 1,5 mL c/ tampa - un	0,08	=====	=====	3	0,24	1	0,08
07	Luva sem talco – un	0,22	1	0,22	3	0,66	1	0,22
08	Água ultraPURE™ (Invitrogen™) - mL	0,18	=====	=====	0,030	0,01	=====	=====
09	Taq DNA polymerase (U)	0,40	=====	=====	2	0,80	=====	=====
10	Primer FV – (10 pMoles)	1,00	=====	=====	1	1,00	1,75	1,75
11	Primer GAB - (10 pMoles)	1,00	=====	=====	2	2,00	1,5	1,50
12	Primer F1AB - (10 pMoles)	1,00	=====	=====	1	1,00	=====	=====
13	dNTP mix – mM	6,2	=====	=====	0,2	1,24	=====	=====
14	Kit Hight Capacity (cDNA) – reação de 25 µL	3,50	=====	=====	1	3,80	=====	=====
16	Kit AccesQuick RT-PCR - por reação de 25 µL	9,25	=====	=====	=====	=====	1	9,25
17	Tubo Cônico para centrifuga 15 mL	0,75	1	0,75	=====	=====	=====	=====
18	Lâmina de Imunofluorescência	1,46	2	2,92	=====	=====	=====	=====
19	Kit Painel Respiratório (7 vírus) - paciente	150,00	1	150,00	=====	=====	=====	=====
20	Extração do ácido nucléico/Eletroforese***	10,04	=====	=====	1	10,04	1	10,04
TOTAL			154,37		31,92		26,55	

* Não estão inclusos os gastos com equipamentos e mão de obra.

** Cotação baseada em valores praticados no ano de 2005.

*** Tabela de cálculo detalhada abaixo.

Tabela de Preços - continuação

Nº	Produto	Preço ~ R\$	Extração do Ácido Nucléico / Eletroforese	
			Quantidade	Preço (R\$)
01	Ponteira com filtro barreira 100µL - un	0,21	3	0,63
02	Ponteira com filtro barreira 1000µL - un	0,21	3	0,63
03	<i>RNAasin RNase Inhibitor</i> – U	0,048	40	1,92
06	Tubo 1,5 mL c/ tampa - un	0,08	2	0,16
07	Luva sem talco – un	0,22	1	0,22
08	Água ultraPURE™ (Invitrogen™) mL	0,176	0,050	0,01
09	Álcool etílico - mL	0,10	0,6	0,06
10	Álcool isopropílico - mL	0,10	0,8	0,08
11	Clorofórmio – mL	0,08	0,2	0,02
12	Trizol mL	4,0	0,25	1,00
13	Agarose - g	5,38	0,3	1,61
14	Tampão/reagents	3,50	1	3,50
15	Ponteira	0,04	5	0,20
TOTAL				10,04

A RT-PCR em tubo único foi a que apresentou maior economia dentre as técnicas comparadas

✍ 20% em relação a RT semi *Nested* PCR

✍ 580% em relação a IFI para 7 vírus respiratório

ANEXO 4 Resultado das amostras colhidas no HU-USP e testadas nas diferentes técnicas comparadas neste trabalho para diagnóstico do HRSV - ano de 2005

Nº AMOSTRA	RT-PCR Tubo único	IFI	RT semi <i>Nested</i> PCR	AMOSTRAS POSITIVAS EM PELO MENOS UMA TÉCNICA
149	+	+	+	+
150	+	+	+	+
151	-	-	-	-
152	-	Inconclusivo	-	-
153	+	+	+	+
154	+	+	+	+
155	-	-	-	-
156	-	-	-	-
157	-	-	-	-
158	+	+	+	+
159	+	+	+	+
160	+	+	+	+
161	-	-	-	+
162	+	+	+	+
163	-	Inconclusivo	-	-
164	+	+	-	+
165	+	+	+	+
166	+	Inconclusivo	+	+
167	-	-	-	-
168	+	+	+	+
169	-	-	-	-
170	-	-	-	-
171	+	+	+	+
172	-	-	-	-
173	-	-	-	-
174	-	-	-	-
175	+	+	+	+
176	-	-	-	-
177	-	-	-	-
178	-	+	-	+
179	+	+	+	+
180	-	-	-	-
181	+	+	+	+
182	-	-	-	-
183	-	-	-	-
184	+	+	+	+
185	-	-	-	-

Nº AMOSTRA	RT-PCR Tubo único	IFI	RT semi Nested PCR	AMOSTRAS POSITIVAS EM PELO MENOS UMA TÉCNICA
186	-	+	-	+
187	-	-	-	-
188	+	+	+	+
189	-	+	-	+
190	-	-	-	-
191	+	+	+	+
193	-	-	-	-
194	+	+	+	+
195	+	+	+	+
196	+	+	+	+
197	-	-	-	-
198	+	+	+	+
199	+	-	+	+
200	+	Inconclusivo	+	+
201	+	Inconclusivo	+	+
202	-	Inconclusivo	-	-
203	+	+	+	+
204	-	-	-	-
205	-	+	+	+
206	-	-	-	-
207	-	-	-	-
208	-	-	-	-
209	-	-	-	-
210	+	+	+	+
211	-	-	-	-
212	+	+	+	+
214	-	-	-	-
215	+	+	+	+
216	+	+	+	+
217	+	+	+	+
218	-	-	-	-
219	+	-	+	+
220	-	-	-	-
221	+	+	+	+
222	+	+	+	+
223	+	-	+	+
224	-	-	-	-
225	-	Inconclusivo	-	+
226	-	-	-	-
227	+	-	+	+
228	+	+	+	+
229	+	+	+	+
230	-	-	-	-
231	-	-	+	+
233	+	+	+	+

Nº AMOSTRA	RT-PCR Tubo único	IFI	RT semi Nested PCR	AMOSTRAS POSITIVAS EM PELO MENOS UMA TÉCNICA
234	-	-	-	-
235	-	Inconclusivo	-	-
236	+	+	+	+
237	+	+	+	+
238	-	-	-	-
239	-	-	-	-
240	-	Inconclusivo	-	-
241	-	+	+	+
242	+	+	+	+
243	+	+	+	+
244	-	-	-	-
245	+	-	+	+
246	-	-	-	-
247	-	-	-	-
248	-	+	-	+
249	+	+	+	+
250	+	-	+	+
251	+	-	+	+
252	+	+	+	+
253	-	-	-	-
254	-	-	-	-
255	+	+	+	+
256	+	+	+	+
257	-	-	-	-
258	+	+	+	+
259	+	+	+	+
260	+	+	+	+
261	+	+	+	+
262	+	+	+	+
263	-	-	-	-
264	-	Inconclusivo	-	-
265	+	+	+	+
266	+	+	+	+
267	-	-	-	-
268	-	-	-	-
269	-	-	-	-
270	-	-	-	-
271	+	+	+	+
272	-	+	+	+
273	-	-	-	-
274	+	+	+	+
275	+	+	+	+
276	-	-	-	-
277	-	-	-	-
278	+	+	+	+

Nº AMOSTRA	RT-PCR Tubo único	IFI	RT semi Nested PCR	AMOSTRAS POSITIVAS EM PELO MENOS UMA TÉCNICA
279	+	+	+	+
280	-	-	-	-
281	+	+	+	+
282	+	+	+	+
283	-	-	-	-
284	-	-	-	-
285	+	-	+	+
286	-	Inconclusivo	-	-
287	+	+	+	+
288	-	Inconclusivo	-	-
289	-	Inconclusivo	-	-
290	+	Inconclusivo	+	+
291	-	Inconclusivo	-	-
292	+	+	+	+
293	+	+	+	+
294	-	Inconclusivo	-	-
295	-	-	-	-
296	-	-	-	-
297	-	-	-	-
298	-	-	-	-
299	-	-	-	-
300	-	-	-	-
301	+	+	+	+
302	-	-	-	-
303	-	-	-	-
304	-	-	-	-
305	+	+	+	+
306	+	-	+	+
307	+	+	+	+
308	+	+	+	+
309	+	Inconclusivo	+	+
310	-	-	-	-
311	-	-	-	-
312	-	Inconclusivo	-	-
313	-	-	-	-
314	-	Inconclusivo	-	-
315	+	-	+	+
316	+	+	+	+
317	-	-	-	-
318	+	+	+	+
319	+	+	+	+
320	+	+	+	+
321	+	+	+	+
322	-	Inconclusivo	-	-
323	+	+	+	+

Nº AMOSTRA	RT-PCR Tubo único	IFI	RT semi Nested PCR	AMOSTRAS POSITIVAS EM PELO MENOS UMA TÉCNICA
324	-	-	-	-
325	+	+	+	+
326	+	+	+	+
327	-	-	-	-
331	-	+	+	+
332	+	+	+	+
333	-	+	-	+
334	-	-	-	-
335	-	-	-	-
336	-	-	+	+
337	-	-	-	-
338	-	-	-	-
339	-	-	-	-
340	-	-	-	-
341	-	-	-	-
342	-	-	-	-
343	+	+	+	+
344	+	+	+	+
345	-	-	-	-
346	-	-	-	-
347	+	+	+	+
348	+	+	+	+
349	-	-	-	-
352	-	-	-	-
369	-	-	-	-
370	-	-	-	-
371	-	-	-	-
372	-	-	-	-
373	-	-	-	-
374	-	-	-	-
375	-	Inconclusivo	-	-
376	-	-	-	-
377	-	-	-	-
378	-	Inconclusivo	-	-
379	-	-	-	-
380	-	-	-	-
381	-	-	-	-
382	-	Inconclusivo	-	-
383	-	Inconclusivo	-	-
384	-	-	-	-
385	-	Inconclusivo	-	-
386	-	-	-	-
387	-	-	-	-
388	-	-	-	-
389	-	-	-	-

Nº AMOSTRA	RT-PCR Tubo único	IFI	RT semi Nested PCR	AMOSTRAS POSITIVAS EM PELO MENOS UMA TÉCNICA
390	-	-	-	-
391	-	-	-	-
392	-	-	-	-
393	-	-	-	-
394	-	-	-	-
395	+	+	+	+
396	-	-	-	-
397	-	-	-	-
398	-	-	-	-