

LUCIANA PENICHE MOREIRA

Comparação de testes laboratoriais para detecção de Vírus  
Respiratório Sincicial Humano (VRSH) em amostras clínicas de  
crianças ambulatoriais e adultos transplantados de medula óssea com  
suspeita de infecção respiratória aguda atendidos no Hospital São  
Paulo.

Dissertação apresentada à Disciplina de  
Infectologia da Universidade Federal de São Paulo  
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2011

LUCIANA PENICHE MOREIRA

Comparação de testes laboratoriais para detecção de Vírus  
Respiratório Sincicial Humano (VRSH) em amostras clínicas de  
crianças ambulatoriais e adultos transplantados de medula óssea com  
suspeita de infecção respiratória aguda atendidos no Hospital São  
Paulo.

**Orientador:** Profa. Dra. Nancy Cristina Junqueira Bellei

São Paulo  
2011

Moreira, Luciana Peniche

Comparação de testes laboratoriais para detecção de Vírus Respiratório Sincicial Humano (VRS) em amostras clínicas de crianças ambulatoriais e adultos transplantados de medula óssea com suspeita de infecção respiratória aguda atendidos no Hospital São Paulo. Luciana Peniche Moreira -- São Paulo/SP – Brasil, 2011.

xv, 118f. : Il. color.; 31cm

Orientador: Nancy Cristina Junqueira Bellei

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação Ciências Básicas em Infectologia.

1. Vírus Respiratório Sincicial Humano 2. Comparação de Métodos  
3. Transplantados de Medula óssea I. Bellei, Nancy Cristina Junqueira.  
II. Universidade Federal de São Paulo

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento: Dr. Reinaldo Salomão  
Chefe da Disciplina: Dr. Eduardo Alexandrino Servolo de Medeiros  
Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Dr. Ricardo Sobhie Diaz

LUCIANA PENICHE MOREIRA

Comparação de testes laboratoriais para detecção de Vírus Respiratório Sincicial Humano em amostras clínicas de crianças ambulatoriais e adultos transplantados de medula óssea com suspeita de infecção respiratória aguda atendidos no Hospital São Paulo.

**Presidente da Banca: Profa. Dra. Nancy Cristina Junqueira Bellei**

#### **BANCA EXAMINADORA**

##### **Titulares:**

Dr. André Luiz da Silva Domingues – Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

Dra Lily Yin Weckx – Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Dra. Daisy Maria Machado – Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

##### **Suplente:**

Dr Luiz Mário Ramos Janini- Universidade Federal de São Paulo- UNIFESP

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais Luiz e Maria da Luz pelo esforço, carinho e dedicação em minha formação pessoal e profissional. Aos meus irmãos, Letícia, Rogério, Junior, Aninha e minha tia Catia, pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis, e por estarem sempre empenhados em me fazer sorrir. São vocês que proporcionam sempre os melhores momentos da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente quero agradecer à Deus que ilumina meus passos e me concede força e coragem diante das dificuldades me fazendo sempre seguir em frente.*

*À Professora Nancy Bellei pela confiança depositada em mim na realização deste trabalho, por estar sempre disposta a incentivar novas ideias e estimular a busca do conhecimento, por sua dedicação e preocupação em todos os momentos e por fazer valer verdadeiramente o sentido da palavra “Orientadora”.*

*Ao Professor Celso Granato por representar um exemplo de empenho e dedicação à pesquisa científica.*

*Ao meu Tutor, Ari, por ter me acompanhado desde minha chegada ao laboratório, por estar sempre disposto a ajudar e ensinar, por não perder a paciência ao me ver insatisfeita com uma primeira explicação, pelo contrário, por estar sempre disposto a buscar a resposta que eu não poderia contestar. Por se preocupar, por me estimular, por confiar em mim, por ser meu amigo... Por isso tudo Ari, eu ainda te devo muitas cervejas.*

*À Elaine Lima por me auxiliar nos cuidados com as culturas de células, à Sandrinha por sua disposição em ajudar e Emerson pelas excelentes ideias e importantes colaborações.*

*À Ellen (que me fez ver que eu não era tão organizada quanto eu pensava), que em meu primeiro dia de estágio probatório me pareceu tão brava e depois se mostrou tão divertida e companheira que transformou o coleguismo no laboratório em uma amizade daquelas que se leva pra vida toda.*

*Às amigas Ju e Thata pelas conversas descontraídas, pelos momentos de diversão e também pelos momentos sérios nos quais podemos partilhar experiências, conselhos e sentimentos.*

*À equipe do laboratório de virologia, Clarice, Tati, Sheilla, Janete, Juninho, Andréia, Miriam Monique e Diane pela ajuda e compreensão nos momentos em que precisei.*

*À minha família, pai, mãe, meus irmãos e minha tia, pelo apoio incondicional, pelo amor, carinho e dedicação que é tão importante para a manutenção de meu equilíbrio, agradeço a vocês por serem a minha paz.*

*À todos os meus amigos, os de perto, os de longe, e até mesmo aqueles que estão em outras cidades ou estados, que nunca deixaram de me apoiar, em especial à amiga Iris.*

*Às meninas do Lado A (Laboratório de Imunologia), que fizeram parte do meu dia a dia de trabalho e de muitas diversões.*

*Ao CNPq pelo apoio financeiro sem o qual eu não poderia ter me dedicado a este trabalho.*

## EPÍGRAFE

### Viagem

Aparelhei o barco da ilusão  
E reforcei a fé de marinheiro.  
Era longe o meu sonho, e traiçoeiro

O mar...

(Só nos é concedida

Esta vida

Que temos;

E é nela que é preciso

Procurar

O velho paraíso

Que perdemos).

Prestes, larguei a vela

E disse adeus ao cais, à paz tolhida.

Desmedida,

A revôlta imensidão

Transforma dia a dia a embarcação

Numa errante e alada sepultura...

Mas corto as ondas sem desanimar.

Em qualquer aventura,

O que importa é partir, não é chegar.

António Gedeão



## RESUMO

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (VRS) é considerado o principal causador de infecções do trato respiratório inferior, principalmente bronquiolite e pneumonia em crianças e recém nascidos, e tem se mostrado também um importante agente de infecção respiratória aguda em imunocomprometidos. Há uma grande variedade de técnicas disponíveis para o diagnóstico do VRS, diferindo em termos de sensibilidade, custo e tempo para obtenção dos resultados. Fatores pré-analíticos como coleta e processamento de amostras, podem interferir no resultado final. O presente estudo analisou alguns dos métodos diagnósticos disponíveis para VRS e verificou se o serviço oferecido ao Hospital São Paulo (HSP) é satisfatório na identificação dos pacientes infectados. Foram analisados dois grupos distintos de pacientes com sintomas de infecção do trato respiratório, no ano de 2008, um composto por crianças da comunidade, menores de 12 anos, atendidas no Núcleo de Assistência a Saúde do Funcionário (NASF) e outro composto por pacientes em programa de transplante, atendidos na enfermaria ou ambulatório de Transplante de Medula Óssea (TMO) do HSP. As amostras de crianças foram submetidas aos métodos de isolamento viral (ISO), imunofluorescência direta (IFD) e reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR), as amostras dos pacientes TMO foram submetidas ainda a teste imunocromatográfico (TI). A comparação entre as técnicas foi realizada utilizando a RT-PCR como padrão ouro. O pico de detecção do VRS no grupo de crianças ocorreu em Abril, e no grupo de TMO o vírus foi detectado de forma homogênea entre os meses de Março e Junho. Das 128 amostras de crianças, 18 (14%) foram positivas para VRS em ao menos uma técnica. A positividade para as técnicas de ISO, IFD e RT-PCR foi de 3,1%, 11,7% e 14% respectivamente. O valor do coeficiente *kappa* para a comparação entre RT-PCR e ISO foi de 0,32 e para a comparação entre RT-PCR e IFD foi de 0,89. Entre as 111 amostras do grupo TMO, 19 (17,1%) foram positivas para VRS em ao menos uma técnica. A positividade para as técnicas de ISO, TI, IFD e RT-PCR foi de 0,96%, 4%, 10,8% e 12,6% respectivamente. O valor do coeficiente *kappa* para a comparação entre RT-PCR e ISO foi de 0,13, para a comparação entre RT-PCR e IFD foi de 0,48 e comparando RT-PCR e TI o valor do coeficiente foi de 0,46. Com este trabalho podemos concluir que a baixa sensibilidade da técnica de ISO e do TI não justifica sua utilização na rotina diagnóstica. No grupo de crianças a utilização da técnica de imunofluorescência direta para vigilância epidemiológica é suficiente. Para os pacientes imunossuprimidos a imunofluorescência direta deve ser utilizada para a realização de vigilância, porém, em situações específicas, a RT-PCR deve ser considerada como importante ferramenta para o aumento da taxa de detecção do VRS.

## ABSTRACT

The human respiratory syncytial virus (HRSV) is considered the main cause of lower respiratory tract infection, mainly bronchiolitis and pneumonia in children and newborn, and has been an important cause of acute respiratory infection in immunocompromised patients. There is much diversity of available techniques for diagnosis of HRSV differing in sensitivity, cost and time to obtain results. Pre-analytical factors such as samples collection and processing, may affect results. This study had analyzed some available methods for HRSV diagnosis and verified if the laboratory services offered to the Sao Paulo Hospital (HSP) are satisfactory in the identification of infected patients. We analyzed two patients groups with respiratory tract infection symptoms in the year 2008, the first one included community children under 12 years old, attended at “Núcleo de Assistência a Saúde do Funcionário (NASF)”, and the second one included patients on transplant program, attended on the bone marrow transplant (BMT) unit of HSP. Children samples were tested by viral isolation (ISO), direct immunofluorescence (DIF) and polymerase chain reaction preceded by reverse transcription (RT-PCR), the immunocompromised patients samples were also tested in a immunochromatographic assay (IT). The comparisons among the techniques were performed using the RT-PCR as gold standard. The detection peak of HRSV in children occurred in April, and in the BMT group the virus was detected evenly between the months of March and June. Of the 128 children samples, 18 (14%) were positive for HRSV in at least one technique. The positivity for ISO, DIF, and RT-PCR was 3.1%, 11.7% and 14% respectively. The *kappa* coefficient from comparisons between RT-PCR and ISO was 0.32 and 0.89, from RT-PCR and DIF. Among the 111 samples of immunocompromised patients, 19 (17.1%) were positive for HRSV in at least one technique. The positivity for ISO, IT, DIF and RT-PCR was 0.96%, 4%, 10.8% and 12.6% respectively. The *kappa* coefficient from comparison between RT-PCR and ISO was 0.13, 0.48 from RT-PCR and DIF and 0.46 from RT-PCR and IT comparisons. We conclude that the low sensitivity of both viral isolation and immunochromatographic assay do not support its use on routine practice. For the children group, DIF is considered sufficient for epidemiological surveillance. For immunocompromised patients, the DIF should be used for surveillance, but, in some special circumstances, RT-PCR should be considered as an important tool to increase the detection rates of HRSV.

## **Lista de Abreviaturas**

ECP = Efeito citopático

IFD = Imunofluorescência direta

IRA = Infecção Respiratória Aguda

ISO = Isolamento viral

ITRI = Infecção do trato respiratório inferior

MEM = Meio mínimo essencial

NASF = Núcleo de apoio à saúde do funcionário

RT-PCR = Reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa

DICT<sub>50</sub> = Dose infectante em cultura de tecidos 50%

TI = Teste Imunocromatográfico

TMO = Transplante de medula óssea

SFB = Soro fetal bovino

VRSH = Vírus respiratório sincicial humano

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 01</b>	Estrutura do Vírus Respiratório Sincicial	20
<b>Figura 02</b>	Incidência de patógenos causadores de infecção do trato respiratório em crianças	25
<b>Figura 03</b>	Pacientes que tiveram mais de uma amostra coletada	45
<b>Figura 04</b>	Gel de agarose mostrando o limite de detecção da RT-PCR	57
<b>Figura 05</b>	Relação entre a ocorrência de IRA e positividade para VRSH	61
<b>Figura 06</b>	Frequência mensal de casos de Vírus Respiratório Sincicial com relação ao total de amostras em cada população	62
<b>Figura 07</b>	Isolamento viral em cultura de células	63
<b>Figura 08</b>	Técnica de Imunofluorescência Direta	64
<b>Figura 09</b>	Gel de agarose mostrando a visualização do resultado da amplificação de amostras	64
<b>Figura 10</b>	Teste imunocromatográfico para detecção de Vírus Respiratório Sincicial	65
<b>Figura 11</b>	Distribuição da detecção de Vírus Respiratório Sincicial Humano na população de crianças pelos testes realizados de acordo com o tempo de início de sintomas apresentado pelo paciente até o início da coleta.	67
<b>Figura 12</b>	Distribuição da detecção de Vírus Respiratório Sincicial em amostras de pacientes transplantados de medula óssea pelos testes realizados, de acordo com o tempo de início de sintomas apresentado pelo paciente até o início da coleta.	71
<b>Figura 13</b>	Pacientes A, B, C, D, E, F e G que tiveram mais de uma coleta realizada e ao menos uma amostra positiva através dos testes realizados.	73

## Lista de tabelas e quadros

<b>Quadro 01</b>	Estudos que utilizam mais de um método diagnóstico para detecção do Vírus respiratório sincicial	30
<b>Tabela 01</b>	Interpretação do coeficiente Kappa	55
<b>Tabela 02</b>	Distribuição de positividade para Vírus Respiratório Sincicial por faixa etária e sua proporção com relação às amostras positivas e com relação ao total de amostras coletadas em cada faixa etária.	59
<b>Tabela 03</b>	Número de casos de Vírus Respiratório Sincicial por mês, ocorridos em cada população e sua proporção com relação ao total de amostras coletadas	61
<b>Tabela 04</b>	Comparação da detecção do Vírus Sincicial Respiratório nas 128 amostras de crianças pelas técnicas de Isolamento viral, IFD e RT-PCR	66
<b>Tabela 05</b>	Distribuição de detecção por método de acordo com o número de amostras testadas.	69
<b>Tabela 06</b>	Comparação da detecção de Vírus Respiratório Sincicial nas amostras de pacientes em programa de transplante, pelas técnicas de Isolamento viral, IFD, RT-PCR e Teste Imunocromatográfico realizadas paralelamente.	69
<b>Tabela 07</b>	Número de amostras testadas e com diagnóstico positivo através da combinação dos diferentes testes realizados	71

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Histórico .....	17
1.2	Características do Vírus.....	18
1.2.1	Classificação, estrutura e genoma viral.....	18
1.2.2	Ciclo replicativo .....	20
1.2.3	Labilidade.....	21
1.2.4	Infecciosidade.....	22
1.2.5	Patogenia .....	22
1.2.6	Aspectos clínicos .....	23
1.3	Aspectos epidemiológicos .....	24
1.3.1	Sazonalidade.....	24
1.3.2	Aspectos demográficos e impactos .....	25
1.3.2.1	População infantil.....	25
1.3.2.2	População de pacientes imunossuprimidos .....	28
1.4	Diagnóstico laboratorial .....	29
1.4.1	Isolamento viral em cultura celular .....	32
1.4.2	Imunofluorescência .....	33
1.4.3	Métodos moleculares.....	34
1.4.4	Testes imunocromatográficos.....	35
1.4.5	Utilização clínica dos diferentes ensaios.....	36
1.5	Prevenção e tratamento .....	37
2.	JUSTIFICATIVA.....	39
3.	OBJETIVOS.....	41
3.1	Objetivos gerais.....	42
3.2	Objetivos específicos.....	42

4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	43
4.1	População .....	44
4.2	Aplicação do questionário e processamento das amostras .....	45
4.3	Detecção através de imunofluorescência direta .....	47
4.4	Detecção através de isolamento viral em cultura de células .....	48
4.4.1	Cultura de células .....	48
	Teste de isolamento viral de amostra clínica em cultura de célula para	
4.4.2	utilização como controle positivo.....	49
4.4.3	Titulação por TCID <sub>50</sub> .....	49
4.4.4	Detecção em amostras clínicas.....	50
4.5	Extração de ácido nucléico.....	51
4.6	Detecção por reação em cadeia da polimerase .....	51
4.6.1	Primers e reação de transcrição .....	51
4.6.3	Amplificação .....	52
4.6.4	Análise dos produtos amplificados.....	52
4.6.5	Teste de sensibilidade.....	53
4.7	Teste rápido para detecção de VRSH.....	53
4.8	Análise estatística .....	54
5.	RESULTADOS .....	56
5.1	Análise da sensibilidade dos ensaios.....	57
5.1.1	Determinação do DICT50 .....	57
5.1.2	Determinação da sensibilidade da RT-PCR .....	57
5.2	Descrição das populações e avaliação das amostras clínicas .....	58
5.3	Avaliação isolada dos ensaios utilizados.....	62
5.3.1	Detecção através de isolamento viral .....	62
5.3.2	Detecção através de imunofluorescência direta .....	63

	Detecção através de reação em cadeia da polimerase precedida por	
5.3.3	transcrição reversa.....	64
5.3.4	Detecção através de ensaio imunocromatográfico .....	65
5.4	Avaliação comparativa dos ensaios utilizados para as duas populações.....	65
5.4.1	População de crianças do NASF .....	65
5.4.2	População TMO .....	68
5.5	Resultados adicionais .....	74
6.	DISCUSSÃO.....	75
7.	CONCLUSÃO.....	90
8.	REFERÊNCIAS .....	92
9.	ANEXOS.....	108
9.1	Anexo A (Termo de consentimento livre e esclarecido).....	109
9.2	Anexo B (Questionário para o grupo de crianças) .....	110
9.3	Anexo C (Questionário para os pacientes em programa de transplante) .....	111
9.4	Anexo D (Dados clínicos e resultado dos testes para os pacientes NASF).....	112
9.5	Anexo E (Dados principais e resultado dos testes para os pacientes TMO) ....	115
9.6	Anexo F (Aprovação do Comitê de Ética) .....	117



# *Introdução*

# 1 1 INTRODUÇÃO

## 2 1.1 HISTÓRICO

3 No ano de 1937, um surto de pneumonia foi identificado nas enfermarias pediátricas  
4 de dois hospitais de Minneapolis (Minnessota-EUA). Neste episódio, 32 casos de infecção  
5 ocorreram levando nove recém nascidos ao óbito. A sintomatologia e patologia peculiar assim  
6 como o caráter epidêmico da infecção indicavam uma possível etiologia viral e biópsias  
7 realizadas no epitélio bronquial dos casos fatais mostraram inclusões citoplasmáticas  
8 características (Adams, 1941), apesar disso os pesquisadores não foram capazes de isolar o  
9 agente e o surto permaneceu sem etiologia conhecida.

10 Em 1956, Morris e colaboradores notaram que um grupo de chimpanzés estava sendo  
11 acometido por uma doença respiratória caracterizada pela presença de tosse, espirros e  
12 secreção nasal mucopurulenta. A partir destas observações os pesquisadores, utilizando a  
13 técnica de isolamento viral, detectaram um agente causador de efeito citopático que foi  
14 denominado “Chimpanzee Coryza Agent (CCA)” (Morris et al., 1956). Estudos feitos  
15 posteriormente em humanos identificaram as cepas que foram denominadas Long e  
16 Schneider, obtidas de pacientes com broncopneumonia e crupe, respectivamente (Chanock et  
17 al., 1957a, b).

18 Em razão da semelhança entre os isolados dos macacos com as cepas Long e  
19 Schneider e levando em consideração a predileção do agente pelo trato respiratório e a  
20 observação de efeito citopático viral característico, com formação de sincício, os  
21 pesquisadores passaram a denominá-lo Vírus Respiratório Sincicial (VRS) (Chanock et al.,  
22 1957a).

23 Assim em 1961, mais de vinte anos após a publicação do surto nos hospitais em  
24 Minneapolis, Adams e col. passaram a estudar um surto muito semelhante ao do ano de 1937,  
25 encontrando a mesma sintomatologia e as mesmas inclusões citoplasmáticas, porém desta vez

1 foram capazes de identificar o agente etiológico como sendo o recém descoberto Vírus  
2 Respiratório Sincicial Humano (VRSB) (Adams et al., 1961).

3 A partir destas primeiras descobertas o VRSB foi rapidamente associado a infecções  
4 respiratórias e atualmente ele é considerado o principal causador de doença do trato  
5 respiratório inferior, especialmente bronquiolite e pneumonia, em crianças e recém nascidos  
6 (Gardner et al., 1967; Collins et al., 2001; Kesson, 2007), além de se mostrar um importante  
7 agente de infecção respiratória aguda em idosos, pacientes de alto risco e  
8 imunocomprometidos (Hertz et al., 1989; Ison & Hayden, 2002; Falsey et al., 2005).

9 No Brasil, o primeiro artigo relatando o isolamento do vírus foi publicado em 1964,  
10 como resultado de um estudo realizado em São Paulo, a partir de amostras obtidas de crianças  
11 internadas com quadro respiratório agudo (Candeias, 1967).

12

## 13 1.2 CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS

### 14 1.2.1 CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA E GENOMA VIRAL

15 O VRSB é classificado na ordem *Mononegavirales* e pertence à família  
16 *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* e gênero *Pneumovirus*. (Collins et al, 2001)

17 As partículas virais são envelopadas, pleomórficas, com cerca de 150 a 300nm de  
18 diâmetro e possuem nucleocapsídeo helicoidal. O envelope é constituído por uma bicamada  
19 lipídica derivada da membrana plasmática da célula hospedeira. (Collins et al, 2001)

20 O genoma viral é constituído por RNA linear não segmentado, fita simples, polaridade  
21 negativa de aproximadamente 15kb que codificam 10 proteínas, sendo oito estruturais e duas  
22 não estruturais.

23 A figura 01 mostra a estrutura do vírus respiratório sincicial e os genes que compõe  
24 seu material genético.

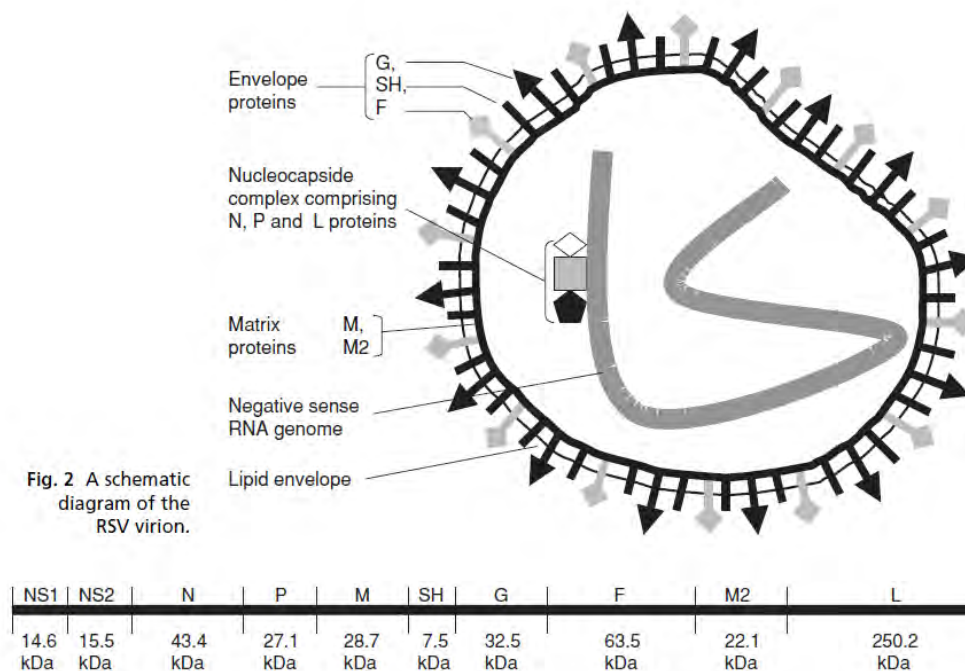


Fig. 2 A schematic diagram of the RSV virion.

1

2 Figura 01: Estrutura do Vírus Respiratório Sincicial. Fonte: McNamara & Smyth, 2002.

3 As glicoproteínas F, inativada em sua forma íntegra, e G, atravessam o envelope viral  
 4 e constituem antígenos de superfície sendo os primeiros alvos da resposta imune do  
 5 hospedeiro (Harris & Werling, 2003).

6 Em células infectadas, a proteína F é ativada através de sua clivagem por  
 7 endoproteases celulares formando as proteínas menores F1 e F2. Ela é responsável pela  
 8 penetração do vírus na célula e pela fusão das membranas celulares o que resulta na formação  
 9 de células gigantes multinucleadas, os sincícios (McNamara & Smyth, 2002). A formação  
 10 destes sincícios é resultado da reestruturação do citoesqueleto das células epiteliais,  
 11 promovidas pela interação entre a proteína F e a guanosina trifosfatase (GTPase) RhoA, uma  
 12 proteína celular que controla numerosas atividades celulares como, por exemplo, mudança na  
 13 morfologia celular e reorganização do citoesqueleto (Pastey et al, 1999), além de estar  
 14 associada também a expressão de citoqueratina-17 pelas células epiteliais infectadas pelo  
 15 VRSV. A citoqueratina-17 faz parte de uma família de proteínas que constituem um dos

1 principais componentes da rede de filamentos que forma o citoesqueleto (Domachowske et al,  
2 2000).

3 A proteína G é responsável pela adesão do vírus às células. Em meados de 1985,  
4 foram descritos dois subgrupos do vírus, A e B, de acordo com a variação de epítomos das  
5 proteínas F e G, através da utilização de anticorpos monoclonais (Anderson et al., 1985;  
6 Mufson et al, 1985). Enquanto a proteína F apresenta poucas variações em seus genes, a  
7 proteína G apresenta grande variabilidade genética e antigênica entre os grupos A e B  
8 (Johnson et al, 1987).

9 As proteínas SH (*Small hidrophobic*), M (proteína de matriz), e M2 são proteínas  
10 associadas ao envelope. Ao nucleocapsídeo estão associadas a nucleoproteína N, a  
11 fosfoproteína P e a grande nucleoproteína L , principal componente da polimerase viral (Ogra,  
12 2004). NS1 e NS2 são proteínas não estruturais e estudos demonstram que a deleção dos  
13 genes codificadores destas proteínas resulta em uma expressiva redução da eficácia de  
14 replicação *in vivo* (Hacking & Hull, 2002).

15

## 16 1.2.2 CICLO REPLICATIVO

17 Todos os eventos envolvidos no ciclo replicativo do VRSV ocorrem no citoplasma  
18 celular, sem envolvimento nuclear (Collins et al, 2001). A replicação ocorre de forma  
19 ordenada iniciando-se pela adesão do vírus aos receptores de membrana da célula hospedeira  
20 através da proteína G. O envelope viral se funde com a membrana plasmática da célula  
21 hospedeira através da proteína F promovendo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma  
22 celular e iniciando o processo de transcrição do genoma viral pela polimerase viral (Ogra,  
23 2004). O RNA viral serve como molde para o RNA mensageiro (RNAm) que atua como  
24 molde para a tradução das proteínas virais e ocorre também a geração de um RNA  
25 complementar positivo (RNAc [+]), o anti genoma, que age como molde na replicação de

1 novos genomas virais que posteriormente se unem as estruturas formadas pelas proteínas  
2 virais formando novas partículas virais (Cowton et al, 2006).

3 A infecção pelo VRSH resulta na formação de inclusões citoplasmáticas densas que  
4 parecem consistir de nucleocapsídeos (Collins et al, 2001).

5 As partículas virais adquirem o envelope lipoprotéico no momento da liberação, que  
6 geralmente ocorre por brotamento.

7

### 8 1.2.3 LABILIDADE

9 O VRSH é um vírus muito frágil, de conhecida labilidade, muito sensível a extremos  
10 de temperatura e pH. Estudos realizados utilizando condições diferentes de temperatura  
11 demonstraram que a perda de infecciosidade quando estocado a -30°C, por apenas quatro  
12 semanas, pode chegar a 90% e a 4°C por uma semana resta somente 1% de partículas virais  
13 infecciosas. Apesar da maior estabilidade a -65°C, mesmo a essa temperatura a perda de  
14 infectividade ainda ocorre (Hambling, 1964; Gupta et al, 1996).

15 Os experimentos de Hambling (1964) demonstraram ainda que partículas estocadas a  
16 4°C permanecem viáveis por mais tempo se estiverem em solução com pH 7,5 e que valores  
17 superiores a este são melhor tolerados com relação a valores inferiores, o que deveria ser  
18 levado em conta durante a preparação do meio de transporte da amostra.

19 Esta instabilidade do VRSH causa perdas virais importantes durante o transporte e  
20 armazenamento de amostras clínicas, o que pode interferir no diagnóstico adequado  
21 principalmente quando realizado o isolamento viral.

22

23

24

25

#### 1 1.2.4 INFECCIOSIDADE

2 O VRSH é muito contagioso e a transmissão ocorre através de contato direto ou  
3 próximo com secreções contaminadas, gotículas ou fômites. O vírus pode permanecer viável  
4 em mãos contaminadas por mais de meia hora, e por algumas horas na superfície de objetos  
5 contaminados, dependendo do tipo de superfície e da temperatura e umidade do meio  
6 ambiente (Bricks, 2001), este fato pode explicar sua grande importância como agente  
7 causador de infecções nosocomiais, principalmente pela facilidade em transmitir partículas  
8 infecciosas viáveis após o contato manual com superfícies contaminadas (Hall, 2000).

9 As crianças e imunocomprometidos infectados excretam vírus por um longo período e  
10 em alto título, aumentando o risco de transmissões, principalmente nosocomiais. As crianças  
11 geralmente excretam o vírus por um período de quatro a sete dias, podendo variar entre três e  
12 onze dias (Hall et al., 1978; von Linstow et al, 2006) e os imunocomprometidos podem  
13 excretar o vírus por longos períodos, em alguns casos podendo ser detectado mais de dois  
14 meses após o início dos sintomas (Harrington et al, 1992; Avetisyan et al, 2009). Geralmente  
15 o vírus é introduzido nas unidades de transplante através de funcionários ou visitantes que  
16 apresentam sintomas leves de infecção do trato respiratório superior (Latchford & Shelton,  
17 2003). Sendo assim, precauções como o isolamento de pacientes infectados devem ser  
18 tomadas rapidamente e por longos períodos a fim de evitar infecções nosocomiais (Hall,  
19 2000).

20

#### 21 1.2.5 PATOGENIA

22 As células alvo para a replicação do VRSH são as células ciliadas do epitélio do trato  
23 respiratório. O vírus se replica primeiramente nas células do trato respiratório superior, após  
24 um período de incubação de dois a oito dias, levando a um processo inflamatório que inclui a  
25 destruição do epitélio, edema e aumento da produção de muco (Bricks, 2001). A fusão das

1 membranas de células adjacentes, causada pelo vírus, leva a formação de sincícios que tem  
2 sido considerado um dos principais modos de disseminação do VRSV no epitélio respiratório,  
3 sem necessidade de exposição ao fluído extracelular, permitindo assim a evasão do sistema  
4 imune, especialmente da ação de anticorpos neutralizantes (Collins et al, 2001).

5 A replicação e proliferação dos vírus no epitélio bronquiolar levam à destruição das  
6 células ciliadas epiteliais, removendo um importante mecanismo de defesa local. O tecido do  
7 hospedeiro responde mobilizando um infiltrado de leucócitos, a secreção de muco aumenta, e  
8 espessos tampões são formados no lúmen bronquiolar compostos por restos celulares e  
9 acúmulo de fibrina, ocluindo os pequenos bronquíolos e levando ao aparecimento de um  
10 complexo de sintomas clínicos específicos denominado bronquiolite (Aherne et al. 1970).

11

#### 12 1.2.6 ASPECTOS CLÍNICOS

13 Em geral os quadros de bronquiolite se estabelecem, principalmente, em crianças  
14 menores de um ano, após um curto período de sintomas de infecção do trato respiratório  
15 superior e são caracterizados por chiado, dispnéia, taquipnéia, e evidência radiológica de  
16 hiper-expansão pulmonar (Hall, 2001). O pulmão da criança está particularmente propenso a  
17 desenvolver essas lesões devido ao pequeno calibre dos bronquíolos e a pobre ventilação  
18 colateral dos alvéolos vizinhos (Aherne et al., 1970).

19 Na maioria dos casos a duração da hospitalização é de até sete dias, porém crianças  
20 com doenças de base, como doença pulmonar crônica, podem necessitar um tempo maior de  
21 internação (Ogra, 2004). Outro fator que pode prolongar o período de internação é a  
22 predisposição, causada pela infecção viral, ao aparecimento de infecções bacterianas devido  
23 aos danos causados ao epitélio (Jansen et al, 2008).

24 Em pacientes imunocomprometidos a presença de sintomas exclusivos do trato  
25 respiratório superior pode ocorrer, mas, geralmente, a infecção se dissemina para o trato



1 respiratório inferior em um a três dias causando uma pneumonia viral similar às causadas por  
2 outros vírus, mas que pode vir a ser fatal (Latchford & Shelton, 2003).

3 As infecções do trato respiratório superior em pacientes transplantados de medula  
4 óssea apresentam sinais característicos, como secreção nasal e tosse, seguidos do  
5 desenvolvimento de sintomas de infecção do trato respiratório inferior, como taquipnéia e  
6 hipóxia (Raboni et al, 2003).

7

### 8 1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

#### 9 1.3.1 SAZONALIDADE

10 A sazonalidade é uma das principais características epidemiológicas do VRSH, com  
11 epidemias anuais sendo observadas a intervalos regulares que variam de acordo com o clima e  
12 que podem se comportar de forma diferente de ano para ano.

13 Em países de clima temperado os surtos ocorrem nas estações mais frias e nas áreas de  
14 clima tropical e subtropical na estação de chuvas (Simões, 1999).

15 No Brasil, como em outros países, o VRSH frequentemente circula na mesma estação  
16 que o vírus influenza e sendo o maior país da América do Sul, a diversidade climática aqui  
17 encontrada parece afetar a sazonalidade do vírus nos diferentes estados, tornando a ocorrência  
18 do VRSH não uniforme entre as diferentes regiões. Estudos realizados na região Nordeste  
19 demonstram marcada sazonalidade do vírus no primeiro semestre do ano com associação  
20 entre a ocorrência de picos de infecção e a estação das chuvas (Moura et al., 2006).

21 Nas cidades da região sudeste como Rio de Janeiro e São Paulo, com clima  
22 subtropical, os surtos começam em Março ou início de Abril atingindo picos em Maio  
23 (Ricetto et al., 2006; Pecchini et al., 2008), porém um estudo realizado na cidade de Vitória  
24 no Espírito Santo, observou a ocorrência de casos em 10 dos 12 meses do ano, sendo a  
25 maioria com início no verão com picos se estendendo até o meio do outono (Checon et al.,

1 2002). O perfil das infecções por VRSH no país mostra a ocorrência de picos epidemiológicos  
 2 na primeira metade do ano, exceto na região sul, a única com clima temperado, onde os picos  
 3 de infecção por VRSH ocorrem nos meses de julho e agosto (Straliotto et al., 2001).

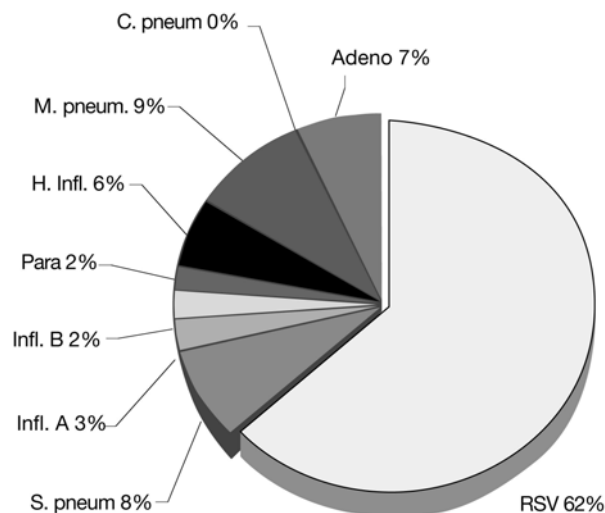
4 Em uma estação, tanto o VRSH A quanto o B podem ser os agentes causadores da doença,  
 5 pode ocorrer a circulação dos dois subgrupos juntos ou um dos dois pode ser dominante  
 6 (Gilca et al., 2006; Arbiza et al., 2005).

7

### 8 1.3.2 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E IMPACTO

#### 9 1.3.2.1 POPULAÇÃO INFANTIL

10 O VRSH é o patógeno mais importante associado às infecções respiratórias agudas  
 11 (IRA) tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. O vírus é considerado  
 12 o principal agente etiológico viral de infecção do trato respiratório inferior (ITRI) em crianças  
 13 (Figura 02), e tem se mostrado a principal causa de hospitalização por infecção do trato  
 14 respiratório em menores de dois anos (Gilca et al., 2006).



15

16

17

Figura 02: Incidência de patógenos causadores de infecção do trato respiratório em crianças. Fonte: Simoes & Carbonell-Estrany, 2003.

18

19

Estima-se que quase todas as crianças se infectam com VRSH pelo menos uma vez até os dois anos de idade (Madhi et al., 2006) e que em países em desenvolvimento um terço de

1 todas as mortes em crianças com menos de cinco anos de idade sejam causadas por infecções  
2 respiratórias agudas (Weber et al., 1998). Além disso, o VRSH é responsável por até 90% das  
3 hospitalizações por bronquiolite e até 40% por pneumonia (Hall, 2001), o que determina  
4 grande impacto na qualidade de vida e elevadas perdas econômicas (Macartney et al., 2000).  
5 Mesmo em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, o número de hospitalizações de  
6 recém nascidos por infecção do trato respiratório causada por VRSH é de cerca de 75 a 125  
7 mil por ano (Shay et al., 1999).

8 A morbidade e mortalidade associadas a esse agente etiológico parecem ser maiores  
9 em crianças com menos de três meses de idade e naquelas que possuem algum fator de risco  
10 conhecido (Pecchini et al., 2008). Os principais fatores que aumentam os riscos de  
11 hospitalização por ITRI são prematuridade, doenças pulmonares crônicas, doenças congênitas  
12 e imunossupressão (Wang et al., 1996). Em geral a mortalidade associada ao vírus esta em  
13 torno de 0 a 3% na maioria dos estudos realizados (Pecchini et al., 2008; Nokes et al., 2009).

14 Vários estudos ao redor do mundo demonstram a importância do VRSH na ocorrência  
15 de infecções em crianças. No início dos anos noventa, um estudo realizado em 10 países em  
16 desenvolvimento mostrou que o VRSH era responsável por até 70% dos casos de ITRI em  
17 crianças menores de cinco anos (Selwyn, 1990). Na Jordânia, um estudo prospectivo,  
18 realizado em 743 crianças com menos de cinco anos apresentando ITRI, detectou a presença  
19 de infecção por VRSH em 64% dos casos (Khuri-Bulos, 2010). No Quênia, Nokes e col.  
20 (2009) estudaram 6.026 crianças, associando o VRSH a cerca de 19% dos casos de  
21 pneumonia grave, com uma taxa de hospitalização estimada em 1.107 casos por 100.000 por  
22 ano em recém nascidos.

23 Em um estudo baseado na informação encaminhada por laboratórios clínicos,  
24 utilizando dados do “National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System  
25 (NREVSS)”, o “Centers for Disease Control (CDC)”, localizado em Atlanta, EUA,

1 determinou que entre julho de 2009 e fevereiro de 2010, período em que ocorrem os picos de  
2 incidência do VRSH em países de clima temperado, foram realizados mais de 300 mil testes  
3 antigênicos contra este vírus, sendo observada uma positividade de 16% (CDC, 2010). Outros  
4 estudos realizados nos Estados Unidos demonstram ainda positividade superior a 20% para o  
5 vírus em crianças com até dois anos (Bourgeois et al., 2009) e uma estimativa de 200 a 500  
6 mortes por ano associadas ao VRSH em crianças jovens (Shay et al., 2001).

7 Na Europa no ano de 2003 foi criado um grupo para tentar implementar um programa  
8 de vigilância para VRSH utilizando o sistema de vigilância já existente para o vírus influenza.  
9 Foram analisadas amostras dos anos de 2001 – 2008 e a positividade encontrada para VRSH  
10 variou entre 4 a 18% nos países participantes, sendo estes, República Tcheca, França,  
11 Alemanha, Holanda e Reino Unido, representado por Inglaterra e Escócia (Meerhoff et al.,  
12 2009).

13 No Brasil estudos realizados com crianças nos estados de São Paulo, Ceará e Espírito  
14 Santo apontam uma positividade variando entre 15 a 30%, com maior concentração de casos  
15 em menores de dois anos e elevada associação com internações por bronquiolite (Pecchini et  
16 al., 2008). A mortalidade estimada fica em torno de 0 a 2% na maioria dos casos (Ricetto et  
17 al., 2006; Moura et al., 2006; Checon et al, 2002).

18 Um estudo realizado na cidade de São Paulo analisou amostras de crianças coletadas  
19 no momento da admissão para internação e detectou VRSH em 42,2% das amostras que  
20 tiveram etiologia viral esclarecida (Vieira et al, 2001).

21 Apesar de vários estudos serem realizados para avaliar a ocorrência de VRSH em  
22 crianças no Brasil, poucos estudos são realizados em crianças da comunidade, a maioria  
23 utiliza amostras de crianças hospitalizadas ou admitidas para internação, ou seja, que já  
24 apresentam complicações.

25

### 1 1.3.2.2 POPULAÇÃO DE PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS

2 Além de ser predominante em infecções do trato respiratório em crianças, o VRSH é  
3 considerado o agente etiológico viral mais relevante na morbimortalidade de pacientes  
4 imunocomprometidos, atingindo taxas de mortalidade de mais de 50% (Soldatou & Davies,  
5 2003; Ebbert & Limper, 2005). Os transplantados de medula óssea parecem estar sob risco  
6 ainda maior, em consequência da extrema imunossupressão a qual são submetidos, tanto a  
7 resposta imune celular quanto humoral tornam-se comprometidas deixando os pacientes  
8 incapazes de responder de forma adequada, ou mesmo incompleta, a infecção viral (Ebbert &  
9 Limper, 2005).

10 Muitos surtos têm sido descritos em pacientes imunocomprometidos, mostrando que  
11 em geral a infecção do trato respiratório superior progride para o trato respiratório inferior em  
12 40 a 60% dos casos (Bowden, 1997) e as taxas de mortalidade chegam a cerca de 80% em  
13 indivíduos que desenvolvem pneumonia (Harrington et al., 1992; Small et al, 2002).

14 Um estudo retrospectivo realizado na Inglaterra por McCarthy e col. (1999), analisou  
15 572 pacientes imunocomprometidos com sintomas de ITRI em cinco anos, onde foi  
16 encontrada uma incidência de VRSH de 6,3% e uma taxa de mortalidade de 19,2%. Por outro  
17 lado, um estudo realizado na Escócia demonstrou que a implementação de medidas de  
18 controle rápidas e eficazes podem fazer com que não ocorram mortes em surtos pelo VRSH  
19 (Jones et al., 2000).

20 No Brasil, em um estudo de Raboni e col. (2003), foram analisadas 810 amostras de  
21 pacientes transplantados de medula óssea apresentando sintomas de IRA, hospitalizados ou  
22 atendidas no ambulatório, e a presença de vírus respiratórios foi verificada em 17% das  
23 amostras sendo que, em 22% delas foi encontrada positividade para VRSH. Este estudo  
24 mostrou ainda que 50% dos pacientes que tiveram amostras positivas para VRSH  
25 apresentaram pneumonia e a mortalidade por esse vírus foi de 26%.

1            Outro estudo, realizado no Estado de São Paulo também com pacientes transplantados  
2 de medula, mostrou uma positividade para VRSH de 39,7%, destes 55,5% desenvolveram  
3 pneumonia e a mortalidade encontrada foi de 6,6% (Machado et al, 2003).

4            Apesar de causar sintomatologia mais grave em crianças e imunocomprometidos,  
5 infecções ocorrem em todas as idades, e reinfecções são comuns ao longo da vida em função  
6 da resposta humoral deficiente que ocorre nas infecções naturais (Hacking & Hull, 2002),  
7 porém a infecção raramente ocorre de forma grave ou fatal em adultos saudáveis, sendo em  
8 geral assintomática ou causadora de sintomatologia leve a moderada do trato respiratório  
9 superior (Ogra, 2004).

10

#### 11    1.4    DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

12            Uma série de técnicas laboratoriais pode ser utilizada no diagnóstico, diferindo em  
13 termos de sensibilidade, custo e tempo para a obtenção dos resultados (Landry & Ferguson,  
14 2000). A grande variabilidade das técnicas muitas vezes torna difícil a escolha do método  
15 mais adequado à realidade do laboratório e aos recursos disponíveis. O quadro 01 apresenta  
16 vários estudos que utilizam mais de uma técnica diagnóstica para a detecção do VRSH, nele  
17 podemos visualizar a variabilidade existente entre os trabalhos para a escolha do tipo de  
18 amostra, tipo de técnica utilizada e os métodos pelos quais essas técnicas são realizadas.

Quadro 01: Estudos que utilizam mais de um método diagnóstico para detecção do Vírus respiratório sincicial.

Referência	Tipo de amostra	População	Isolamento Viral			RT-PCR			Teste Rápido		Imunofluorescência	
			Número de amostras	Número de Positivas (%)	Tempo de Isolamento	Tipo de PCR	Número de Amostras	Número de positivas (%)	Nome do teste e nº de Amostras	Número de Positivas (%)	Número de Amostras	Número de Positivas (%)
Nascimento et al, 2008	AN; SN	226 amostras de crianças < 5 anos	-	-	-	Nested RT-PCR; One Step RT-PCR	226	One-step:92 (40,7); Nested: 96 (42,5)	-	-	226	84 (37)
Vaz de Lima et al. 2008	AN; SN	306 amostras de crianças < 5 anos	-	-	-	RT-PCR	306	132 (43,1)	ICA-BD: 306	113 (36,9)	306	113 (36,9)
Reis et al, 2008	AN	173 amostras de crianças seguidas desde o nascimento até os 24 meses	315	20 (6,3)	10 dias; em casos negativos passagem cega e mais 10 dias de isolamento	Nested RT-PCR	316	35 (11,1)	-	-	316	25 (7,9)
Deiman et al, 2007	AN; SN; LB	779 amostras	765	61 (8)	10 dias; confirmação por IF	RSV NASBA assay	765	229 (29,9)	Binax NOW: 106	0 (0)	529	122 (23)
Bonroy et al, 2007	AN; SN; LB	778 amostras de crianças < 5 anos	-	-	-	Real Time	778	306 (39,3)	Respistrip: 778	200 (25,7)	-	-
Moore et al, 2006	AN; SN; LB	508 amostras de crianças e adultos	492	62 (13)	-	Real Time NASBA	508	147 (28,9)	Binax NOW:45	1 (2,2)	339	101 (31)
Aldous et al, 2005	LN	330 amostras de pacientes menores de 18 anos	330	49 (14,8)	10 dias com passagem cega em 72h e 10 dias	RT-PCR	330	107 (32,4)	330	95 (28,8)	330	103 (31,2)
Gregson et al, 2005	AN	236 amostras de crianças < 17 anos	-	-	-	-	-	-	Respistrip: 236	108 (45,7)	236	115 (49)
Van Kraaij, 2005	SN	52 episódios de IRA em pacientes transplantados com > 18 anos	52	1 (2)	-	RT-PCR	52	6 (12)	-	-	-	-

LN= Lavado Nasal; AN= Aspirado Nasal; SN= Swab Nasal; crianças= crianças; RT-PCR= Reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa.

Quadro 01 (Continuação): Estudos que utilizam mais de um método diagnóstico para detecção do Vírus respiratório sincicial.

Referência	Tipo de amostra	População	Isolamento Viral			RT-PCR			Teste Rápido		Imunofluorescência	
			Número de amostras	Número de Positivas (%)	Tempo de Isolamento	Tipo de PCR	Número de Amostras	Número de positivas (%)	Nome do teste e nº de Amostras	Número de Positivas (%)	Número de Amostras	Número de Positivas (%)
Kuypers et al, 2004	Swab nasofaríngeo	750 amostras de menores de 20 anos	-	-	-	Real Time	750	286 (38,1)	-	-	750	267 (35,6)
Kuroiwa et al, 2004	SN	102 amostras de çças < 9 anos	--	-	-	Multiplex RT-PCR	102	79 (77,5)	102	SAS-RSV: 66 (64,7); Directigen EZ-RSV: 55 (53,9)	-	-
Ohm-Smith et al, 2004	LN; AN; SN	180 amostras - 127 çças < 3anos; 53 adultos >16 anos	180	47 (26) - 34% de çças e 8% de adultos	12 a 14 dias; confirmação por IF	-	-	-	DRSV: 180; NOW: 118; EZ: 88	DRSV: 41 (22,8); NOW: 31 (26,3); EZ: 14 (16)	149	44 (29,5)
Slinger et al, 2004	AN	133 amostras de çças	56 (negativas na IF)	0	8 dias; confirmação por IF	-	-	-	133	QL assay: 72 (54,1); Directigen RSV: 59 (44,4)	133	77 (57,8)
Reina et al, 2004	AN	4950 amostras de çças	4950	1577 (31,8)	Dois dias até a leitura ( <i>Shell Vial</i> )	-	-	-	Directigen RSV test	1360 (27,4)	-	-
Weinberg et al, 2004	SN	668 amostras de çças < 5 anos	668	47 (7)	10 dias; confirmação por IF	RT-PCR	668	122 (18,22)	-	-	-	-
Erdman et al, 2003	SN	470 amostras de çças <5 anos	405	44 (10,9)	10 a 14 dias confirmação por IF	GeneScan RT-PCR	470	41 (8,7)	-	-	65	25 (38,5)
Mentel et al, 2003	AN	71 amostras de çças	-	-	-	Nested RT-PCR; Real Time	72	Nested: 19 (26,7); Real Time: 25 (35,2)	-	-	-	-
Van Elden et al, 2002	SN; LB	43 adultos com câncer hematológico	43	4 (9,3)	10 dias; confirmação por IF e teste rápido	Nested RT-PCR	43	5 (11,6)	-	-	-	-

LN= Lavado Nasal; AN= Aspirado Nasal; SN= Swab Nasal; çças= crianças; RT-PCR= Reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa.



1 Fatores como cuidados na preservação e concentração do VRSH na amostra podem  
2 interferir na sensibilidade do teste, assim como o tipo de material coletado.

3 A coleta de aspirado nasofaríngeo e lavado nasal são as mais indicadas para a detecção  
4 de vírus respiratórios (Frayha et al., 1989). A coleta de swab também pode ser realizada, mas,  
5 estudos mostram diminuição de sua eficiência na recuperação de partículas virais com relação  
6 ao aspirado e lavado nasofaríngeo principalmente com relação a recuperação do VRSH  
7 (Ahluwalia et al, 1987; Heikkinen, 2002).

8 Em geral amostras clínicas de crianças apresentam maiores concentrações do vírus do  
9 que as obtidas a partir de secreções de adultos (Walsh et al, 2001). Adultos  
10 imunocomprometidos e idosos tendem a excretar o vírus por um período prolongado,  
11 tornando-o detectável por mais tempo (Okiro EA, 2010).

12

#### 13 1.4.1 ISOLAMENTO VIRAL EM CULTURA CELULAR

14 O isolamento viral em cultura celular (ISO) é o método clássico de diagnóstico do  
15 VRSH desde a descrição do vírus em 1956, embora tenha sido utilizado como padrão ouro  
16 por muito tempo, a eficácia deste método vem sendo questionada devido ao desenvolvimento  
17 de técnicas mais rápidas e mais sensíveis (Henrickson & Hall, 2007).

18 Apesar de poder ser isolado em diversas linhagens celulares, preferencialmente células  
19 de linhagem epitelial, o VRSH replica melhor em células HEp-2, derivadas de carcinoma de  
20 laringe humano (Perini et al., 2007). O tempo necessário para o aparecimento do efeito  
21 citopático característico é, em média, de três a sete dias, mas pode aparecer somente após o  
22 décimo dia em alguns casos (Welliver, 1988).

23 A técnica de detecção em cultura de células através de *Shell vial* utiliza centrifugação  
24 para favorecer o processo de adsorção e detecta proteínas virais precocemente, antes da

1 formação de efeito citopático, através da associação com imunofluorescência, diminuindo  
2 consideravelmente o tempo necessário para detecção (Çiçek et al, 2007).

3 A sensibilidade da técnica de isolamento viral convencional apresenta considerável  
4 variação de acordo com os diferentes estudos realizados, a maioria variando entre 30 a 70%  
5 quando comparada a imunofluorescência e métodos moleculares (Kehl et al, 2001; Weinberg  
6 et al, 2004; Reis et al, 2008).

7 Muitas vezes pode ocorrer falsos negativos devido à natureza lábil do VRSH, coleta  
8 inadequada da amostra ou atrasos em seu processamento (Aldous, 2004). Além de levar muito  
9 tempo e muitas vezes não determinar o isolamento, esta técnica requer profissionais treinados  
10 para sua execução e é extremamente laboriosa. Apesar disso, o isolamento viral em cultura  
11 celular continua sendo um método muito importante para o estudo dos vírus em geral,  
12 principalmente na área de pesquisa, para analisar as mudanças, tanto antigênicas quanto  
13 genéticas, que podem ocorrer, principalmente através de mutações, que podem torná-los  
14 indetectáveis por outras técnicas, além de ser muito importante no descobrimento de novos  
15 vírus (Henrickson & Hall, 2007; Hughes et al., 1988).

16

#### 17 1.4.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA

18 A técnica de imunofluorescência, tanto direta (IFD) quanto indireta (IFI),  
19 utilizando anticorpos monoclonais marcados, constitui uma técnica rápida, com diagnóstico  
20 liberado em poucas horas, e de boa sensibilidade quando comparada ao isolamento,  
21 resultando em menor tempo de trabalho e menores custos (Landry & Ferguson, 2000). É  
22 também um método que pode ser utilizado para detectar o VRSH em células de cultura  
23 infectadas, pois geralmente detectam a presença do vírus antes do aparecimento do efeito  
24 citopático (Weinberg et al., 2004).

1 Quando comparada ao isolamento viral a sensibilidade da Imunofluorescência  
2 chega a 100%, variando na maioria dos casos entre 85 - 95%, com especificidade variando  
3 entre 95 e 99% (Landry & Ferguson, 2000; Aldous et al, 2004).

4 A técnica de Imunofluorescência tem sido muito utilizada em substituição ao  
5 isolamento viral como padrão ouro em ensaios de comparação entre métodos moleculares e  
6 testes rápidos (Gregson et al, 2005; Nascimento et al, 2007).

7 Suas limitações incluem a possibilidade de haver um número inadequado de  
8 células epiteliais do trato respiratório na amostra coletada e a possível ocorrência de  
9 fluorescência inespecífica devido à presença de muco na amostra. Estes problemas podem ser  
10 solucionados com a colaboração dos profissionais que realizam a coleta da amostra, devendo  
11 ser realizada apenas por pessoas treinadas, assim como é necessário um profissional com  
12 treinamento especializado para realizar o processamento da amostra e a interpretação do  
13 resultado, pois esta interpretação pode ser considerada subjetiva (Doing et al, 1998).

14

#### 15 1.4.3 MÉTODOS MOLECULARES

16 Os métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) permitem  
17 a detecção de pequenas quantidades de ácido nucléico viral em amostras clínicas através da  
18 amplificação de uma única cópia do material genético alvo milhares de vezes (Boivin et al,  
19 2004).

20 A reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR),  
21 método utilizado para a detecção de vírus RNA, é um método rápido e de alta especificidade e  
22 sensibilidade, tendo sido demonstrado em trabalhos uma maior sensibilidade da RT-PCR com  
23 relação à cultura de células e aos testes de imunofluorescência, pois permite a detecção  
24 mesmo havendo baixa concentração do vírus e não necessita que as partículas tenham  
25 mantido a infectividade, como é o caso do isolamento viral ou da presença de células íntegras,

1 que é um fator limitante para a imunofluorescência (Weinberg et al, 2004; Coiras et al., 2003;  
2 Falsey et al., 2003; Reis et al, 2008).

3 Além de disponibilizar vantagens ao clínico como rápida detecção e diminuição  
4 dos casos falsos negativos, a RT-PCR também se tornou uma técnica muito importante nos  
5 laboratórios de pesquisa para avaliação genômica dos vírus.

6 As principais limitações apresentadas pelos testes de biologia molecular são  
7 problemas como contaminações, custo elevado e necessidade de equipamentos específicos  
8 (Walsh, 2001).

9 A técnica de amplificação Real-Time vem se tornando também um método  
10 diagnóstico importante e representa um avanço da PCR convencional, pois permite a  
11 visualização da detecção do material genético viral no momento em que o mesmo é  
12 amplificado, diminuindo o risco de contaminações causadas por manipulação de material  
13 amplificado e o tempo necessário para detecção, além de permitir a análise quantitativa do  
14 vírus, fato que, em geral, aumenta sua sensibilidade (Fox, 2007; Mentel et al., 2003).

15 Em um estudo de vigilância realizado com adultos o isolamento viral detectou o  
16 VRSH em 46% das amostras enquanto que a RT-PCR detectou, além das amostras positivas  
17 através do isolamento viral, 65% a mais (Casiano-Colón et al. 2003).

18 Alguns estudos demonstram que a sensibilidade da RT-PCR é superior a 90%  
19 quando comparada a Imunofluorescência e é até 70% mais sensível que o isolamento viral  
20 (van Elden et al, 2003; Nascimento et al, 2008).

21

#### 22 1.4.4 TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS

23 Os testes imunocromatográficos (TI), ou testes rápidos, são de fato os métodos  
24 mais rápidos e de fácil utilização disponíveis, podendo ser realizados até mesmo pelo clínico,

1 pois a leitura é visual, não necessitando de equipamentos específicos para a detecção, com  
2 resultados obtidos em torno de trinta minutos (Gregson et al., 2005).

3 Apesar da facilidade de realização e leitura dos testes disponíveis, eles  
4 demonstram grande variabilidade com relação à sensibilidade e especificidade,  
5 principalmente em decorrência da grande variedade de marcas disponíveis no mercado.

6 Em um estudo realizado para analisar três diferentes marcas de testes rápidos para  
7 detecção de antígenos de VRSH com relação ao isolamento viral, a sensibilidade dos testes foi  
8 de 39, 32 e 14%, o fato de que as amostras utilizadas eram de pacientes adultos pode ter  
9 aumentado ainda mais a variabilidade de detecção entre os testes (Casiano-Cólon et al, 2003).

10 Um estudo comparando dois testes imunocromatográficos em amostras de  
11 crianças revelou sensibilidades de 55 e 66% quando comparados a RT-PCR (Kuroiwa et al,  
12 2004).

13 Em geral os estudos realizados demonstram menor sensibilidade do teste  
14 imunocromatográfico com relação aos outros métodos diagnósticos disponíveis, porém  
15 defendem a sua importância devido à possibilidade disponibilizada pelo teste de conhecer o  
16 resultado em apenas alguns minutos (Ginocchio et al., 2010; Borek et al., 2006; Aldous et al.,  
17 2004).

18

#### 19 1.4.5 UTILIZAÇÃO CLÍNICA DOS DIFERENTES ENSAIOS

20 A utilização de uma técnica que proporcione diagnóstico rápido e de alta sensibilidade  
21 para o VRSH é muito importante para o tratamento dos pacientes, quando este está  
22 disponível, principalmente no que diz respeito a respostas mais rápidas como tomada de  
23 medidas de controle da infecção ou evitar o uso desnecessário de antibióticos. Em um estudo  
24 de Madhi e col. (2004) a técnica de imunofluorescência mostrou-se eficaz no diagnóstico do

1 VRSH em amostras de crianças que apresentavam até sete dias de sintomas de infecção  
2 respiratória.

3 Um estudo realizado por Falsey e col., (2002), mostrou que em pacientes infectados  
4 com VRSH que apresentavam sintomas há cinco dias em média, a sensibilidade da RT-PCR  
5 para detecção do vírus foi de 73% comparada a 39% obtida no isolamento viral. O mesmo  
6 grupo de pesquisadores realizou um estudo onde pacientes adultos saudáveis eram inoculados  
7 com o vírus e amostras eram coletadas e analisadas para a presença do vírus diariamente, a  
8 RT-PCR foi eficiente na detecção do vírus até o nono dia pós inoculação, e o isolamento viral  
9 foi eficiente até o sétimo dia pós inoculação (Falsey et al., 2003).

10 Devemos considerar as diferenças existentes entre estudos experimentais e estudos que  
11 analisam pacientes com infecção natural, porém, como exemplificado, o método molecular  
12 aparentemente mostra-se capaz de detectar o VRSH por mais tempo que o isolamento nos  
13 dois diferentes tipos de estudos, além de também detectar o vírus por mais tempo do que a  
14 técnica de imunofluorescência (Falsey et al., 2002, 2003; Madhy, 2004).

15 A detecção do VRSH através dos testes rápidos demonstra ser mais eficiente em  
16 infecções agudas, pois, a capacidade de detecção através destes métodos está amplamente  
17 relacionada à presença de altos títulos virais (Englund et al, 1996).

18

## 19 1.5 PREVENÇÃO E TRATAMENTO

20 A primeira vacina contra o VRSH foi desenvolvida nos anos 60 e era produzida a  
21 partir de vírus inativado com formalina. Algumas das crianças que receberam esta vacina  
22 desenvolveram doença grave após a ocorrência de infecção natural pelo VRSH. Estudos  
23 demonstraram que a vacina inativada produzia uma resposta imunológica exacerbada nas  
24 crianças imunizadas tornando a doença ainda mais grave após o contato natural com o vírus  
25 (Kim et al, 1969; Kapikian et al, 1969). A partir desta grave falha identificada na primeira

1 vacina produzida, muitos obstáculos têm sido encontrados pelos pesquisadores que tentam  
2 produzir uma vacina imunogênica que cause a menor quantidade de reações adversas  
3 possíveis para a população. As proteínas F e G, glicoproteínas virais que induzem a  
4 neutralização e produção de anticorpos, têm sido estudadas como os principais possíveis alvos  
5 para a produção de novas vacinas (Dudas & Karron, 1998).

6 Alternativas como a imunização passiva utilizando anticorpos monoclonais  
7 humanizados, como o Palivizumab, que se liga a proteína F do VRSH, vem sendo estudadas  
8 como tentativa de prevenir as formas mais graves da infecção, porém o estudo do custo  
9 benefício dessa utilização fez com que sua recomendação fosse restringida para grupos  
10 exclusivos de pacientes de risco (Joffe et al., 1999).

11 A ribavirina, medicamento que foi muito utilizado para o tratamento do VRSH,  
12 não é mais recomendada como rotina, mas sua utilização pode ser considerada no tratamento  
13 de indivíduos imunocomprometidos (Wright & Piedimonte, 2010).

14 Por enquanto a forma mais eficaz de controlar as infecções pelo VRSH,  
15 principalmente as nosocomiais, ainda é a implementação de medidas de higiene, como  
16 lavagem das mãos, e utilização de equipamentos de proteção individual, como luvas e  
17 máscaras, impedindo assim a disseminação do vírus por profissionais e familiares. Estes  
18 procedimentos podem diminuir em até oito vezes a ocorrência de infecções nosocomiais  
19 (Hall, 2000).

20

21

*Justificativa*



## 1        2 JUSTIFICATIVA

2

3            Tendo como base a importância clínica do VRSH e a importância de uma intervenção  
4 rápida, tanto para o tratamento quanto para a implantação de métodos preventivos, este estudo  
5 visa investigar a sensibilidade dos diferentes testes disponíveis para o diagnóstico de VRSH,  
6 podendo assim contribuir para o conhecimento, na prática, do melhor fluxo diagnóstico deste  
7 agente etiológico, levando em consideração não apenas o tempo de realização, que é  
8 importante para uma intervenção eficaz, mas também a sensibilidade de cada um quando  
9 comparados entre si e quando analisados com relação às necessidades dos dois diferentes  
10 grupos de pacientes analisados: crianças, frequentemente infectadas com altos títulos virais, e  
11 pacientes imunocomprometidos, que podem apresentar alta morbidade e mortalidade.

12            É nossa intenção avaliar o desempenho do teste de imunofluorescência, que é utilizado  
13 isoladamente na rotina diagnóstica de pacientes de alto risco, para analisar a possível  
14 contribuição da implantação de técnicas mais sensíveis, como tem se mostrado a RT-PCR em  
15 outros estudos, para dar maior segurança aos resultados encaminhados ao clínico.

16

*Objetivos*

### 1 3 OBJETIVOS

#### 2 3.1 OBJETIVOS GERAIS

- 3 • Avaliar o desempenho e concordância do isolamento viral, RT- PCR,  
4 Imunofluorescência Direta e Teste Imunocromatográfico na detecção de VRSH em  
5 amostras de pacientes com suspeita de infecção respiratória aguda.

6

#### 7 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 8 • Avaliar o desempenho dos testes utilizados no grupo de pacientes formado por  
9 crianças avaliadas em pronto atendimento com suspeita de infecção respiratória aguda.

10

- 11 • Avaliar o desempenho dos testes utilizados no grupo de pacientes transplantados de  
12 medula óssea com suspeita de infecção respiratória aguda.

*Casuística e Métodos*

## 1 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 2 4.1 POPULAÇÃO

3 Este é um estudo retrospectivo que envolve a análise de amostras coletadas entre dois  
4 grupos, um grupo composto por crianças e outro composto por pacientes transplantados de  
5 medula óssea, no período de março a dezembro de 2008.

6 Do primeiro grupo da população foram coletadas 128 amostras de 119 filhos de  
7 funcionários do Hospital São Paulo – UNIFESP, atendidos no Núcleo de Assistência à Saúde  
8 dos Funcionários (NASF), com quadro clínico de infecção respiratória aguda.

9 Os critérios de inclusão para este grupo eram crianças, encaminhadas pelo pediatra  
10 responsável pelo atendimento e ciente dos objetivos do estudo, com idade entre zero e 12  
11 anos, eutróficas, com início dos sintomas até cinco dias. Quando solicitado pelo pediatra a  
12 coleta poderia ser realizada em crianças com tempo de sintomas maior do que cinco dias.  
13 Dentre estas, nove crianças tiveram duas amostras coletadas, porém, estas correspondiam a  
14 episódios diferentes de infecção do trato respiratório.

15 Do segundo grupo foram coletadas 111 amostras de 73 pacientes atendidos na  
16 enfermaria de hematologia ou ambulatório de transplantados de medula óssea (TMO), sendo  
17 transplantados de medula ou portadores de doença hematológica em programa de transplante  
18 do Hospital São Paulo, apresentando quadro clínico de infecção respiratória aguda ou,  
19 eventualmente, pacientes assintomáticos que tivessem contato com pacientes apresentando  
20 quadro clínico de infecção. Estes pacientes eram avaliados por um médico infectologista que  
21 entrava em contato com a equipe do laboratório quando havia casos suspeitos.

22 A figura 03 apresenta os 22 pacientes que tiveram mais de uma amostra coletada,  
23 mostrando a quantidade e distribuição das coletas e o número de episódios respiratórios  
24 diferentes que foram observados para cada paciente.

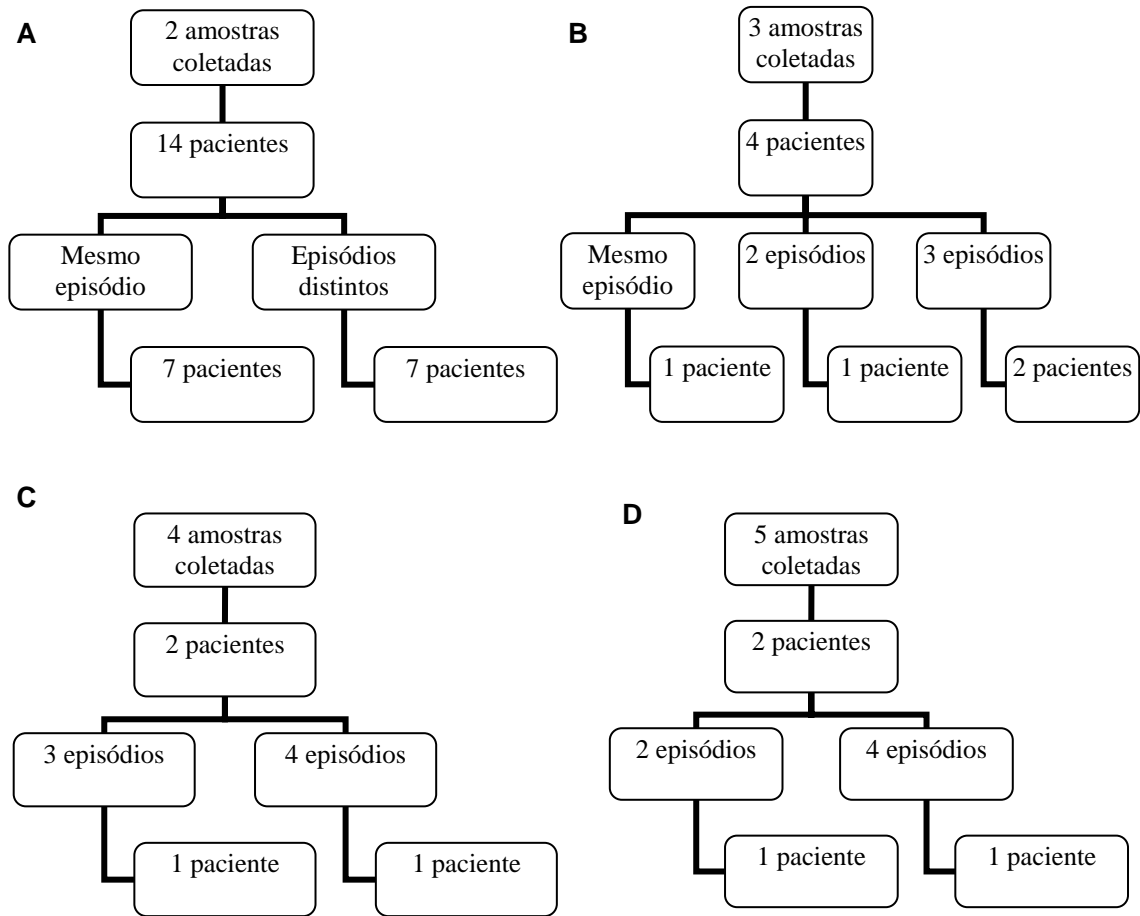


Figura 03: Pacientes que tiveram mais de uma amostra coletada. A: Número de episódios de infecção em pacientes que tiveram duas amostras coletadas; B: Distribuição das coletas em pacientes que tiveram três amostras coletadas; C: Distribuição das coletas em pacientes que tiveram quatro amostras coletadas; D: Distribuição das coletas em pacientes que tiveram cinco amostras coletadas.

#### 4.2 APLICAÇÃO DO QUESTIONÁRIO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para a coleta de amostra das crianças do NASF o adulto responsável, presente no momento da coleta, foi convidado a autorizar a participação da criança no estudo e assinou um consentimento informado (Anexo A) aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UNIFESP (número 0670/08).

As amostras dos pacientes transplantados internados na enfermaria de hematologia foram coletadas como rotina de investigação laboratorial, como serviço prestado ao Hospital São Paulo para o benefício do paciente sem a intenção de pesquisa, por isso, não há termo de consentimento livre esclarecido.

1 A coleta de dados das duas populações e todos os procedimentos a serem realizados no  
2 trabalho tiveram aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo (CEP),  
3 protocolo número 1653/09 (Anexo F).

4 De cada paciente que aceitou participar do estudo foi coletada uma amostra de lavado  
5 nasal ou aspirado nasofaríngeo e aplicado um questionário sobre aspectos epidemiológicos e  
6 clínicos considerados relevantes para o estudo (Anexo B). Em relação ao quadro clínico,  
7 foram investigados: o tempo do início do quadro respiratório; a presença de febre, sintomas  
8 respiratórios e gerais; e a presença de comorbidades como cardiopatias, pneumopatias,  
9 hipertensão arterial e diabetes; os pacientes da enfermaria da hematologia foram questionados  
10 também sobre as doenças de base e fatores de risco ou proteção para aquisição de infecção  
11 viral respiratória, como o contato com criança menor de cinco anos ou a imunização prévia  
12 para o vírus influenza (Anexo C).

13 Para os pacientes adultos a coleta da amostra de lavado nasal foi realizada instilando-  
14 se 5 mL de Ringer-lactato em cada narina e posterior recuperação do lavado em recipiente  
15 coletor estéril. Para as crianças foi coletada uma amostra de aspirado nasofaríngeo realizado  
16 pelo enfermeiro ou médico responsável pelo setor.

17 Uma vez coletada, a amostra foi levada imediatamente ao laboratório de virologia  
18 onde foi alíquotada. Duas alíquotas eram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , uma alíquota para detecção  
19 através de métodos moleculares com aproximadamente 1 mL de amostra pura, e outra  
20 alíquota de amostra pura com meio de transporte de vírus (Cultilab, Brasil) em proporção 1:1  
21 para posterior realização de isolamento viral em cultura celular. O restante da amostra era  
22 utilizado na realização imediata da imunofluorescência direta.

23

24

### 1 4.3 DETECÇÃO ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

2 As amostras eram preparadas para a confecção de lâminas para revelação por IFD para  
3 os vírus respiratório sincicial humano, influenza A (IVA), influenza B (IVB), adenovírus  
4 (AD), parainfluenza tipos 1, 2 e 3 (PIV1, PIV2, PIV3) utilizando o kit “Simulfluor  
5 Respiratory Screen and Panel” (Chemicon Int., EUA).

6 As amostras de lavado nasal eram centrifugadas a 500x g por 5 minutos para  
7 separação das células. Se a amostra continha muco visível era adicionado Acetilcisteína 2%  
8 (Sigma, EUA), homogeneizando bem e deixando em repouso durante 5 minutos, antes da  
9 centrifugação. O sedimento de células era lavado pela adição de 7mL de Solução salina 0,9%,  
10 e centrifugado novamente nas condições descritas anteriormente. Em seguida, 20 $\mu$ L do  
11 sedimento contendo as células resultantes da centrifugação eram transferidos para uma lâmina  
12 e, após seca, era fixado em acetona PA (Merck, Alemanha) por 10 minutos. Eram  
13 confeccionadas duas lâminas contendo um botão de células e duas lâminas contendo seis  
14 botões de células cada, sendo que as lâminas não utilizadas logo após sua preparação foram  
15 congeladas a -20°C envolvidas em papel alumínio.

16 Logo após a fixação das lâminas, uma delas, contendo um botão de células, era  
17 selecionada para a realização da triagem com pool de anticorpos através da adição de 40 $\mu$ L do  
18 reagente “SimulFluor Respiratory Screen” (Chemicon International Inc., EUA) sobre o botão  
19 de células já fixadas na lâmina. Após a incubação em câmara úmida a 37°C durante 30  
20 minutos, a lâmina era lavada com PBS (“Phosphate buffered saline”) por 5 minutos, seca a  
21 temperatura ambiente e protegida de luz, sendo a seguir coberta com glicerol tamponado e  
22 lamínula.

23 A leitura era realizada em microscópio de epifluorescência (Nikon, EUA) com  
24 aumento de 400X, em sala escura. A visualização de células integras com inclusões amarelo-  
25 ouro fluorescentes indicava a presença de VRSH. A presença de células com inclusões verde-



1 maçã fluorescentes indicava a presença de um dos outros vírus respiratórios (Influenza A e B,  
2 Adenovírus e Parainfluenza tipos 1, 2 e 3). Para todas as lâminas com essa positividade  
3 (inclusões verde maçã fluorescentes) era realizada a coloração de uma das lâminas preparadas  
4 previamente com as células do mesmo paciente em 6 botões separados. Cada botão de células  
5 era corado com um reagente específico para cada um dos vírus: Influenza A e B, A  
6 Adenovírus, Parainfluenza 1, 2 e 3 (Chemicon International Inc., EUA). Da mesma forma que  
7 a lâmina anterior, esta era incubada a 37°C durante 30 minutos, lavada com PBS e seca à  
8 temperatura ambiente e protegida de luz. A seguir, o botão de células coradas era coberto com  
9 glicerol tamponado e lamínula para observação ao microscópio quanto à presença de células  
10 com inclusões verde-maçã fluorescentes, indicando a positividade para o respectivo vírus. A  
11 presença de pelo menos uma célula íntegra com inclusões verde-maçã fluorescente  
12 características indicava positividade. Amostras negativas com menos de 20 células íntegras  
13 eram consideradas inadequadas (Landry et al, 2000).

14

#### 15 4.4 DETECÇÃO ATRAVÉS DE ISOLAMENTO VIRAL EM CULTURA DE CÉLULAS

16

##### 17 4.4.1 CULTURA DE CÉLULAS

18 Para o isolamento viral foram utilizadas células da linhagem HEp-2 derivadas de  
19 carcinoma de laringe humana (CCL23, ATCC) cultivadas em garrafas de 25cm<sup>2</sup> contendo  
20 Meio Mínimo Essencial (MEM-Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino  
21 (Gibco, Brasil), sem adição de antimicrobianos, e mantidas em estufa com atmosfera de 5%  
22 CO<sub>2</sub> a 37°C. Após o crescimento, que acontece geralmente dentro de dois a três dias, as  
23 células eram repicadas com auxílio de 500µL de tripsina 10X (Sigma, EUA).

24

#### 1 4.4.2 TESTE DE ISOLAMENTO VIRAL DE AMOSTRA CLÍNICA EM CULTURA DE 2 CÉLULAS PARA UTILIZAÇÃO COMO CONTROLE POSITIVO

3 Para controle positivo da cultura celular foi escolhida uma amostra positiva para  
4 VRSH na imunofluorescência, que foi inoculada em cultura de células HEp2 em tubos com  
5 aproximadamente 70% de confluência. O meio de crescimento (MEM + 10% de SFB) foi  
6 retirado e foram inoculados 200 $\mu$ L da amostra. Após incubação em estufa a 37°C por 1 hora,  
7 foram adicionados 3mL de meio de cultura MEM acrescidos de 3% de SFB. Para o controle  
8 negativo foram inoculados 1mL de MEM em outra cultura de HEp2. As células inoculadas  
9 foram observadas diariamente por um período de 7 dias até o aparecimento do efeito  
10 citopático (ECP).

11 A amostra escolhida como controle foi positiva nos quatro testes realizados  
12 (Imunofluorescência, RT-PCR, isolamento viral e teste imunocromatográfico).

13

#### 14 4.4.3 TITULAÇÃO POR DICT<sub>50</sub>

15 A titulação viral foi realizada através do método das diluições limite, com cálculo do  
16 ponto de infecção 50% de acordo com a metodologia de Reed & Muench (1938).

17 Para tal, preparou-se oito diluições (em proporção 1/10) a partir de uma suspensão  
18 estoque da amostra controle previamente replicada em cultura de células HEp2. Esta série de  
19 diluições foi distribuída em placa de 96 cavidades em proporção 1:1 em oito replicatas  
20 juntamente com uma suspensão de células previamente contadas em Câmara de Neubauer e  
21 acertadas para a concentração de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/mL, e incubada por 72h a  
22 37°C em estufa sob atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após, três leitores diferentes contaram o número  
23 de poços onde o efeito citopático foi positivo e utilizou-se a fórmula:

24

$$\frac{\% \text{ infectividade acima de } 50\% - 50}{\% \text{ infectividade acima de } 50\% - \% \text{ infectividade abaixo de } 50\%}$$

25

$$\% \text{ infectividade acima de } 50\% - \% \text{ infectividade abaixo de } 50\%$$

26

1           A partir desta fórmula determinou-se o valor do título capaz de ocasionar 50% de  
2 efeito citopático ( $DI_{50}$ ) e para determinar o título viral em  $DICT_{50}$ , que representa uma dose  
3 infectante, a esse resultado foi acrescentado o valor correspondente à potência com  
4 porcentagem logo acima de 50%.

5

#### 6 4.4.4 DETECÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS

7           As amostras clínicas e a cepa controle foram inoculadas em duplicata em placas de 24  
8 cavidades contendo células em monocamadas com 70% de confluência. As placas eram  
9 preparadas no dia anterior a inoculação com células na concentração de  $2.10^5$  células/mL.  
10 Primeiramente o meio de cultura era retirado da placa e eram realizadas duas lavagens com  
11 PBS 1X. O PBS era então descartado e 200 $\mu$ L da amostra eram pipetados em cada cavidade.  
12 A placa era incubada por 1h, em estufa a 37°C e atmosfera de 5%  $CO_2$  para adsorção viral.  
13 Antes da inoculação as amostras eram tratadas incubando o inóculo com 1% de  
14 antimicrobianos (1000UI de penicilina/10 mg/mL de estreptomicina (Gibco, EUA), 10mg/mL  
15 de gentamicina (Vitrocell, Brasil) e 250mg/mL de Anfotericina B (Gibco, EUA)) em  
16 geladeira por 30min.

17           Após o período de adsorção eram adicionados 800 $\mu$ L de meio MEM suplementado  
18 com 3% de SFB e 1% de cada antimicrobiano por cavidade. A placa era mantida em estufa de  
19  $CO_2$  a 37°C. As culturas inoculadas eram acompanhadas diariamente para verificação do  
20 aparecimento de ECP característico de VRSH (presença de sincícios).

21           A cada sete dias era realizada passagem para uma nova placa, sendo realizadas três  
22 passagens no total, portanto as amostras eram acompanhadas por 21 dias. Mesmo as amostras  
23 que apresentavam ECP na primeira semana pós inoculação tinham as passagens seguintes  
24 realizadas, da mesma forma que as amostras que não apresentavam ECP. As amostras que

1 apresentassem ECP eram então avaliadas por imunofluorescência para confirmação da  
2 presença de antígenos de VRSH.

3

#### 4 4.5 EXTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO

5 As extrações de ácido nucléico foram realizadas diretamente das alíquotas separadas  
6 anteriormente e mantidas a -80°C para a PCR, através do Kit “QIAmp DNA blood Kit”  
7 (Quiagen, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. Esse Kit permite a  
8 purificação do RNA viral contido nas amostras a partir de quatro passos básicos: lise celular;  
9 adsorção do RNA por colunas formadas por membranas de sílica; lavagem para a retirada de  
10 proteínas e contaminantes que possam inibir a reação de PCR; eluição do RNA da membrana  
11 de sílica.

12 O material extraído foi aplicado na reação de amplificação do genoma do VRSH.

13

#### 14 4.6 DETECÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

##### 15 4.6.1 PRIMERS E REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO

16 Os primers utilizados para a detecção do VRSH foram previamente descritos por  
17 Erdman e colaboradores (2003) e têm como alvo a região conservada do gene F codificador  
18 da proteína de fusão viral, a sequência do primer *forward* utilizado foi: RSVAB-F1, 5'-AAC  
19 AGT TTA ACA TTA CCA AGT GA-3', com nucleotídeos na posição 1124-1146 do gene e a  
20 sequência do primer *reverse* foi RSVAB-R1, 5'- TCA TTG ACT TGA GAT ATT GAT GC-  
21 3', com nucleotídeos na posição 1481-1503 do gene, gerando um fragmento de 380 pares de  
22 bases nucleotídicas.

23 Para a transcrição reversa, 10µL do RNA extraído foram adicionados à mistura  
24 composta por 100U da enzima transcriptase reversa “Moloney Murine Leukemia Virus” (M-  
25 MLV – Invitrogen, EUA), 4µL de tampão de enzima cinco vezes concentrado (250mM de

1 Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 2μL de DTT (dithiothreitol) 0.1M, 1μL da  
2 mistura de dNTPs contendo 20mM de cada desoxinucleotídeo, 0.5μL do primer antisenso  
3 RSVAB-R1 a 10μM, 20U do inibidor de Ribonuclease (RNaseOUT™ – Invitrogen, EUA) e  
4 água MilliQ autoclavada para completar o volume de 20μL.

5 Essa mistura foi incubada a 42°C por 1 hora e inativada a 70°C por 15 minutos em  
6 termociclador.

7

#### 8 4.6.3 AMPLIFICAÇÃO

9 Para a amplificação do material genético foram utilizados 5μL do cDNA obtido na  
10 reação de transcrição, os quais foram colocados em um tubo juntamente com a mistura da  
11 reação, composta por 2.5μL de tampão 10X concentrado (200mM Tris-HCl, pH 8.4, 500mM  
12 KCl), 1.75μL de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 0.5μL dos *primers* RSVAB-F1 e RSVAB-R1, ambos a  
13 20μM, 1μL da mistura de dNTPs contendo 20mM de cada nucleotídeo, 0.5μL de Platinum®  
14 Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brasil) e água MilliQ autoclavada para completar o  
15 volume de 25μL. A mistura foi inicialmente mantida a 95°C por 5 minutos e submetida a 40  
16 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido de  
17 incubação final a 72°C por 7 minutos.

18 Em todas as reações foram utilizados um controle negativo com água Milli-Q  
19 autoclavada substituindo o ácido nucléico, um controle positivo constituído por amostra  
20 clínica sabidamente positiva para VRSH e um controle positivo constituído da amostra  
21 controle replicada em cultura celular.

22

#### 23 4.6.4 ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

24 Os produtos amplificados foram analisados após eletroferose (120Volts por 50min) em  
25 gel de agarose a 1.5% (Invitrogen, EUA) Preparada em tampão 1X TBE (Tampão

1 Tris/Borato/EDTA) corado com SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, EUA) e  
2 visualizados sob luz ultravioleta.

3 O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com padrão de 100 pares de  
4 bases (Invitrogen, EUA) e o gel fotografado sob transiluminação UV.

5

#### 6 4.6.5 TESTE DE SENSIBILIDADE

7 O teste de sensibilidade da RT-PCR foi realizado utilizando o material extraído das  
8 diluições em proporção 1:10 realizadas a partir da suspensão estoque da amostra controle  
9 amplificada em cultura celular com a qual foi realizado o  $DICT_{50}$ .

10

#### 11 4.7 TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE VRSH

12 Foi utilizado o Kit comercial RSV Test Bioeasy (Bioeasy, Brasil) que detecta  
13 qualitativamente antígenos de VRSH. Para a realização do projeto foram disponibilizados 100  
14 testes que foram realizados nas amostras do grupo de pacientes transplantados de medula  
15 óssea que ainda tinham quantidade de alíquota suficiente de acordo com o recomendado pelo  
16 fabricante.

17 O teste utilizado é um ensaio imunocromatográfico que possui anticorpos monoclonais  
18 anti-VRSH fixados na membrana de nitrocelulose e anticorpos especialmente selecionados  
19 como material de captura. Enquanto a amostra aplicada flui através da membrana, o anticorpo  
20 conjugado se liga ao antígeno VRSH presente na amostra formando um complexo antígeno-  
21 anticorpo conjugado. Este complexo ao passar pela região teste se liga aos anticorpos  
22 monoclonais fixados, produzindo uma linha colorida, linha teste “T”. Na ausência de VRS na  
23 amostra testada, não ocorre a formação desta linha.

24 Antes do início do teste as amostras eram retiradas do freezer e, assim que estas  
25 atingissem a temperatura ambiente, 200µL da amostra eram adicionados ao tubo teste

1 juntamente com 200 $\mu$ L de tampão diluente, o tubo era homogeneizado e deixado em descanso  
2 para decantação por 10 minutos. Em seguida a tira teste era retirada da embalagem e inserida  
3 no tubo contendo tampão e amostra. O resultado era interpretado em até no máximo 15  
4 minutos.

5 A linha controle “C” deveria aparecer em todos os testes e caso esta aparecesse  
6 isoladamente o teste era considerado não reagente. Quando apareciam duas linhas coloridas  
7 na janela de resultados, uma indicando a linha controle “C” e a outra indicando a linha teste  
8 “T”, o teste era considerado reagente.

9 Caso a linha controle “C” não aparecesse dentro dos 15 minutos estipulados para  
10 leitura, o teste deveria ser considerado inválido e o mesmo deveria ser realizado novamente  
11 utilizando uma nova tira teste.

12

#### 13 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

14 Foram realizados cálculos estatísticos para avaliação da sensibilidade, especificidade,  
15 valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e concordância a partir de uma  
16 tabela dois por dois em software Microsoft Office Excel versão 2007, fixando o método  
17 diagnóstico de RT-PCR como padrão ouro e comparando-o com as demais técnicas.

18 Foi realizado Teste Exato de Fischer para avaliar associações entre variáveis, com  
19 nível de significância de  $p < 0,05$  *two tailed*. A regressão logística múltipla não condicional foi  
20 aplicada, sendo testadas as variáveis que apresentaram  $p < 0,2$  ao teste exato de Fischer. Os  
21 resultados foram expressos em *odds ratio* (OR), com os respectivos intervalos de confiança  
22 (IC) 95%.

23 Para comparação dos métodos utilizados foi realizado o teste de concordância *Kappa*  
24 através do programa R versão 2.11.1 e a interpretação dos coeficientes de acordo com os

1 níveis de concordância foi realizada utilizando a classificação de Altman DG (1991), segundo  
2 a tabela 01.

3

Tabela 01: Interpretação do coeficiente *Kappa*

Valor do coeficiente Kappa	Nível de concordância
Menor que 0,2	Não há
0,21 – 0,4	Fraca
0,41 – 0,6	Moderada
0,61 – 0,8	Boa
0,81 – 1,0	Forte

4



# *Resultados*

## 1 5. RESULTADOS

### 2 5.1 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DOS ENSAIOS

#### 3 5.1.1 DETERMINAÇÃO DO DICT 50

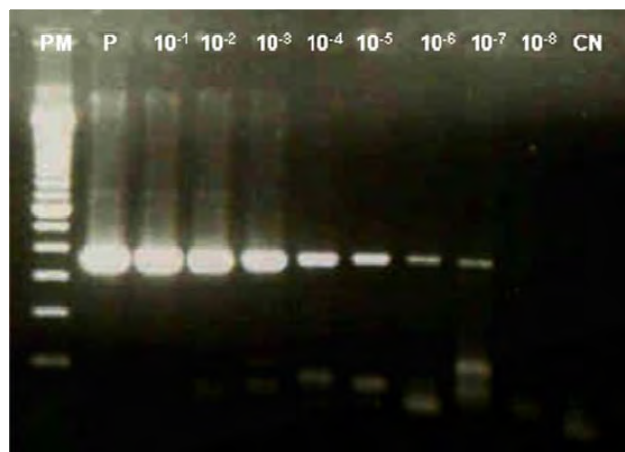
4 O VRSH isolado em cultura a partir de amostra clínica para ser utilizado como  
5 controle foi detectado no máximo até a diluição  $10^{-6}$  no ensaio para determinação do DICT<sub>50</sub>.  
6 Realizando os cálculos segundo o protocolo citado no item 4.4.3, o valor de DICT<sub>50</sub>  
7 encontrado foi de  $10^{-5,11}$ , sendo este então o valor representante de uma dose infectante, capaz  
8 de produzir 50% de efeito citopático em cultura de células. Usando o antilog de -5,11 para  
9 determinar o título viral temos um valor de  $1,2 \times 10^5$  DICT<sub>50</sub>, e transformando isso para  
10 DICT<sub>50</sub>/mL temos  $1,2 \times 10^6$  DICT<sub>50</sub>/mL, ou seja, em 1 mL da amostra controle tínhamos  
11  $1,2 \times 10^6$  DICT<sub>50</sub>.

12

#### 13 5.1.2 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA RT-PCR

14 Para a determinação da sensibilidade da RT-PCR foi utilizado o material extraído das  
15 mesmas diluições 1/10 da suspensão estoque da amostra controle feitas para a determinação  
16 da DICT<sub>50</sub>. Aplicando o protocolo descrito no item 4.6 a amostra controle foi detectada até a  
17 diluição  $10^{-7}$  (Figura 04).

18



19

20 Figura 04: Gel de agarose mostrando o limite de detecção da RT-PCR. PM= Peso Molecular; P=  
21 Amostra pura;  $10^{-x}$ = Diluições das amostras a partir da amostra pura; CN= Controle negativo.

1           Como o limite de detecção da RT-PCR foi de duas diluições a mais que o valor  
2 encontrado para a diluição correspondente a  $1,2 \times 10^5$  DICT<sub>50</sub> a RT-PCR tem a sensibilidade  
3 de 0,12 DICT<sub>50</sub>.

4

## 5 5.2 DESCRIÇÃO DAS POPULAÇÕES E AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

6           Este estudo avaliou 239 amostras distribuídas entre crianças atendidas no Núcleo de  
7 Assistência a Saúde do Funcionário com quadro clínico de infecção respiratória aguda e  
8 pacientes atendidos na enfermaria de hematologia ou ambulatório de transplantados de  
9 medula óssea com sintomas de IRA ou seus contactantes, no período de março a dezembro de  
10 2008. Das 239 amostras, 37 (15,5%) obtiveram resultado positivo em ao menos um dos testes  
11 realizados para detecção de VRSH.

12           No período de estudo, 128 amostras de 119 crianças foram coletadas, sendo que 7,6%  
13 das crianças (9/119) tiveram duas amostras coletadas no período total de estudo, porém, estas  
14 corresponderam a episódios de IRA diferentes com média da diferença de intervalo de coletas  
15 de 2,5 meses. Estas crianças possuíam mediana de idade de oito meses e média de idade de  
16 três anos.

17           A média de idade das crianças atendidas foi de 3,2 anos com desvio padrão de 2,8  
18 anos, variando entre um mês e 11 anos, a mediana de idade foi de dois anos, uma criança não  
19 possuía informação sobre idade na ficha. O tempo de início de sintomas até a data da coleta  
20 variou entre um e 12 dias com mediana de três dias.

21           Das 128 amostras de crianças, 18 (14%) foram positivas para VRSH em ao menos  
22 uma técnica.

23           A tabela 02 mostra a distribuição da positividade para o vírus de acordo com a faixa  
24 etária das crianças.

1 Tabela 02: Distribuição de positividade para Vírus Respiratório Sincicial por faixa etária e sua  
 2 proporção com relação às amostras positivas e com relação ao total de amostras coletadas em  
 3 cada faixa etária.

Faixas etárias	Número de amostras positivas (%)	Número total de amostras coletadas	% de amostras positivas por faixa etária com relação ao total coletado
≤ seis meses	5 (27,8)	19	26,3
> 6 meses - < 1 ano	5 (27,8)	14	35,7
> 1 ano – < 2 anos	2 (11,1)	19	10,5
> 2 anos – < 3 anos	2 (11,1)	16	12,5
>3 anos – < 4 anos	1 (5,6)	13	7,7
> 4 anos - < 5 anos	1 (5,6)	10	10,0
≥ 5 anos	2 (11,1)	36	5,6
Total	18 (100)	127	14,2

4

5 A análise estatística pelo Teste Exato de Fischer mostrou que a diferença entre o  
 6 número de crianças positivas com menos de seis meses e o número de crianças positivas com  
 7 idade entre seis meses e um ano não é significativa ( $p= 0,99$ ). Porém a diferença entre o  
 8 número de crianças positivas com menos de um ano de idade e as crianças com positividade  
 9 nas faixas etárias acima de um ano mostrou ser estatisticamente significativa ( $p= 0,01$ ), sendo  
 10 que crianças com menos de um ano tiveram cerca de 4% mais chance de estarem infectadas  
 11 do que crianças maiores de um ano [OR 4,2; IC 95% (1,5 – 11,8)].

12 No mesmo período foram coletadas também 111 amostras de 73 pacientes em  
 13 programa de transplante de medula óssea atendidos no ambulatório de TMO do Hospital São  
 14 Paulo.

15 Das 111 amostras, 86 (77,5%) foram coletadas durante o período de internação dos  
 16 pacientes, 24 (21,6%) foram coletadas durante consultas ambulatoriais e uma não possuía  
 17 registro quanto à condição do paciente.