

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Detecção do vírus respiratório sincicial pelo isolamento em cultura de células e por reação em cadeia da polimerase, em amostras clínicas previamente triadas por imunofluorescência indireta

Detecção do vírus respiratório sincicial pelo isolamento em cultura de células e por reação em cadeia da polimerase, em amostras clínicas previamente triadas por imunofluorescência indireta

Cláudio José de Carvalho

Faixa 010 12004 Aparelho Pulmão Q10002

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG

Julho – 2003

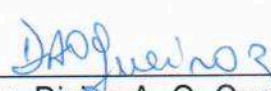
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Detecção do vírus respiratório sincicial pelo isolamento em cultura de células e por reação em cadeia da polimerase, em amostras clínicas previamente triadas por imunofluorescência indireta

Cláudio José de Carvalho

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM 30/07/03

Nota 100,00
CEM

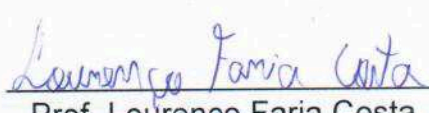


Profa. Dra. Divina A. O. Queiróz



Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi


Universidade Federal de Uberlândia
Prof.^a Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas



Prof. Lourenço Faria Costa

Uberlândia, 17 de setembro de 2003

Ofereço

*Aos meus pais Valdemar e Elza, que
sempre estiveram ao "meu lado"
durante minha graduação, ajudando-me
de todas as formas para que esse sonho
pudesse ser realizado.*

Agradecimentos

Agradeço especialmente à minha orientadora, Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz, que me orientou em Iniciação à Pesquisa I e II, sendo de extrema importância para a minha qualificação profissional e, também, pessoal.

À Thelma Fátima Mattos Oliveira por ter me ensinado a técnica de isolamento em cultura de células e pelo isolamento de ácidos nucléicos do vírus respiratório sincicial através da técnica de reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa.

À Renata Costa pela sua grande ajuda na manutenção das células.

À Lysa Nepomuceno pela leitura das reações de imunofluorescência feitas a partir da cultura de células.

Ao Lourenço Costa por sua ajuda na elaboração do projeto.

Ao Dr. Jonny Yokosawa pela grande contribuição que prestou ao Laboratório de Virologia.

À Profa. Dra. Leonilda Stanziola pela sua contribuição na realização das análises estatísticas.

Ao Laboratório de Imunologia que tem permitido a utilização de equipamentos como microscópio, freezer -70°C e outros.

À Profa. Dra. Daise Rossi, do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária / UFU, pelo empréstimo da máquina de PCR, otimizando a execução deste trabalho

Ao DEFIS/ICBIM e ao Laboratório de Genética Molecular/UFU pelo valioso empréstimo de equipamentos sem os quais não teria sido possível executar a parte molecular deste estudo.

Aos demais membros do Laboratório de Virologia, Márcia Beatriz Cardoso de Paula, Lívia Rossi, Tatiany Calegari, Ana Cláudia Lima, Lucas Zimon, Renata Lemos e Gabriela Dionísio.

Aos amigos, Janainy Martins, Lúbia Fonseca, Luciana Oliveira, Liliane Oliveira, enfim, todos da 49ª Turma de Biologia da UFU pelos 4 anos em que estivemos juntos.

Aos grandes amigos, que me ajudaram durante esta estadia em Uberlândia: Bruno Soares, Clícia Lopes, Lílian Oliveira, Alfredo Berbel, Márcio Vieira, Andréa Bosso, Thiago Dias, Leonardo Campos, William Costa, Gesilmar Borges e todos que contribuíram para o meu crescimento pessoal.

Aos meus pais e irmãos Cleuza, Célia, Cleonice, Carlos, Cleide e Cláudia, pelo apoio e pela ajuda nos momentos em que mais necessitei e também pela confiança e respeito às minhas decisões.

À Deus, pelo dom da vida.

Resumo

O vírus respiratório sincicial (VRS) constitui a principal causa de surtos epidêmicos anuais de bronqueolite e pneumonia em neonatos e crianças jovens em todo o mundo. O isolamento viral em cultura de células (CC) e a reação de cadeia da polimerase (PCR) têm sido referidos como métodos importantes para o isolamento desse vírus, devido, respectivamente, à alta especificidade e sensibilidade dessas técnicas. O objetivo deste estudo foi o isolamento do VRS utilizando os referidos métodos. Durante os anos 2000-2002, aspirados de nasofaringe (NF) de 171 pacientes com doença respiratória aguda, de 0-5 anos de idade, foram coletados no Hospital de Clínicas (HC-UFU) em Uberlândia-MG e testados pela reação de imunofluorescência indireta (IFI). Assim, 38 amostras positivas para o VRS pela IFI, armazenadas com meio de congelamento em freezer -70°C , foram submetidas ao isolamento em cultura de células HEp-2 e pelo método de RT-PCR. Dessas, 44,7% (17/38) foram isoladas em CC e 65,8% (25/38) pelo RT-PCR. A constatação de que em 13 amostras não se conseguiu isolar o VRS por nenhum dos dois métodos mencionados sugere que pode ter havido resultados falso-positivos pela IFI e/ou o armazenamento das amostras com o meio de congelamento não foi adequado.

Palavras Chaves: vírus respiratório sincicial; cultura de células HEp-2; reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa (RT-PCR)

Índice

1 – INTRODUÇÃO	01
2 – MATERIAL E MÉTODOS	04
2.1 – Antecedentes - pacientes e espécimes clínicos	04
2.2 – Isolamento em cultura de células (Fluxograma 1)	04
2.3 – Reação de imunofluorescência indireta (Fluxograma 2)	06
2.4 – Extração de ácidos nucléicos totais (Fluxograma 3)	08
2.5 – Reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa	10
2.6 – Detecção dos produtos amplificados	10
2.7 – Análise estatística / tabulação dos dados	11
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
3.1 – Características dos pacientes	12
3.2 – Isolamento em cultura de células	13
3.3 – Reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa	14
3.4 – Considerações finais	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
APÊNDICE-1	24

1 – Introdução

O vírus respiratório sincicial (VRS) constitui a principal causa de infecções do trato respiratório inferior (TRI) em crianças lactentes, produzindo anualmente surtos epidêmicos de bronqueolite e pneumonia, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (HENDERSON et al., 1979; MIYAO et al., 1999; SULLENDER, 2000; VIEIRA et al., 2001; QUEIROZ et al., 2002).

Quase todas as crianças têm a primeira infecção pelo VRS nos primeiros dois anos de vida (GLEZEN; DENNY, 1973), sendo que o pico de incidência ocorre nos primeiros meses de vida (ANDERSON et al., 1990). Aproximadamente 40% das crianças desenvolvem sintomas de envolvimento do TRI durante essa primeira infecção (OTTOLINE; HEMMING, 1997). Apesar de as infecções serem comuns durante toda a vida, a sintomatologia clínica em crianças mais velhas e adultos é de natureza mais branda (MACDONALD et al., 1982; HALL et al., 1991).

Alguns grupos de pacientes apresentam risco de desenvolver doença grave do TRI. Estes incluem crianças menores de 6 meses de idade (GLEZEN et al., 1981), a despeito da presença de anticorpos maternos transferidos passivamente (COLOCHO ZELAYA et al., 1994), indivíduos com displasia pulmonar (GROOTHUIS et al., 1988) ou com doença cardíaca (MACDONALD et al., 1982; SULLENDER, 2000), idosos (WALSH et al., 2001) e pacientes com outros estados de imunodeficiência (HALL, et al., 1986; CHANDWANI et al, 1990), particularmente aqueles que receberam transplante de medula óssea (CANE, 2001).

Uma investigação realizada na cidade do Rio de Janeiro na década passada mostrou que o pico epidêmico do VRS ocorreu no outono (março a maio) (NASCIMENTO et al., 1991). Na cidade de São Paulo, investigações de 4 anos consecutivos mostraram que a circulação do VRS ocorreu nas estações do outono e inverno, com picos epidêmicos entre os meses de maio e junho (MIYAO et al., 1999; VIEIRA et al., 2001). Especificamente no Triângulo Mineiro, a detecção do pico de

circulação do VRS no mês de maio, sugere que esse vírus apresenta uma sazonalidade semelhante à de outras regiões do Sudeste (CARVALHO et al., 2002).

O VRS foi isolado pela primeira vez de chimpanzés com infecção do trato respiratório superior, em 1954, e foi denominado agente da coriza do chimpanzé (MORRIS et al., 1956). Subseqüentemente, Chanock et al. (1957) isolaram esse vírus de crianças com infecção do TRI, e o renomearam de vírus respiratório sincicial devido a capacidade desse vírus de formar sincício em cultura de células e pelo fato de o vírus ter sido recuperado de infecções do TRI de crianças.

O VRS é um membro da família *Paramyxoviridae*, gênero *Pneumovirus* e possui genoma do tipo RNA de fita simples linear com polaridade negativa. Outros membros do gênero *Pneumovirus* incluem o VRS bovino, caprino e ovino que estão relacionados ao VRS humano e ao vírus da pneumonia de camundongos (CANE, 2001). Embora os humanos constituam o único reservatório dos tipos do VRS que os infectam, ainda não se sabe onde as diferentes cepas do VRS residem após os surtos epidêmicos, quando as infecções são raras (OTTOLINE; HEMMING, 1997).

Análises de seqüências de nucleotídeos do VRS permitiram a identificação de 11 genes: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-ORF1, M2-ORF2 e L. Esses genes são transcritos seqüencialmente em distintos RNAs mensageiros, e subseqüentemente traduzidos em 11 proteínas (DOMACHOWSKE; ROSEMBERG, 1999).

Baseado nessa seqüência de nucleotídeos foi demonstrado que os isolados do VRS podem ser divididos em dois grupos antigênicos, distintos geneticamente (PERET et al., 2000), A e B, a partir da reação com anticorpos monoclonais, particularmente contra as proteínas P, F e G (MUFSON et al., 1985; GIMENEZ et al., 1986). As proteínas F e N são altamente conservadas entre os grupos mostrando 91% e 96% de similaridade em suas seqüências de aminoácidos, respectivamente. Ao contrário, a proteína G é altamente variável, sendo que a similaridade da seqüência de aminoácidos dessa proteína entre as cepas A2 (grupo A) e 18537 (grupo B) é de somente 53% (SULLENDER, 2000; CANE, 2001), enquanto que o gene da proteína SH apresenta diversidade intermediária, mostrando 76% de similaridade dos aminoácidos entre os dois isolados.

Na Dinamarca, um estudo de três surtos epidêmicos consecutivos detectou diferentes subgrupos do VRS predominando a cada ano (JOHANSEN et al., 1997). Esses autores observaram tipos genômicos de VRS com características

semelhantes às cepas isoladas há mais de 2 décadas em outras partes do mundo, e sugeriram que a baixa flutuação temporal de cepas poderia indicar que o genoma do VRS seria relativamente estável geneticamente.

Peret et al. (1998), investigando 5 surtos consecutivos em uma mesma comunidade nos Estados Unidos, identificaram uma alternância anual de genótipos, sem predomínio de nenhum deles por mais de um ano. Os autores sugeriram que essa alternância poderia ser consequência de pressão seletiva da resposta imune desenvolvida na população em um surto anterior. Posteriormente, o mesmo grupo observou, em um estudo multicêntrico de 5 comunidades nos Estados Unidos, a circulação simultânea de 5 a 7 genótipos, com predomínio de uma ou duas cepas por comunidade (PERET et al., 2000).

A caracterização antigênica em subgrupos e subtipos dos VRS circulantes em determinada região constitui dado epidemiológico importante, principalmente com vistas ao estudo da resposta imune para o desenvolvimento de uma eventual vacina (ANDERSON et al., 1991). Entretanto, quando estudos de caracterização molecular são necessários, o sucesso no isolamento viral é crucial (PHA/WHO/CDC, 1997; PHA/WHO/CDC, 1999).

Tendo em vista a relevância clínica e epidemiológica do VRS e objetivando isolar esse vírus para fins futuros de caracterização molecular, amostras clínicas de crianças de 0-5 anos de idade com doença respiratória aguda, provenientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, previamente triadas para o VRS pela reação de imunofluorescência indireta, foram submetidas ao isolamento em cultura de células HEp-2 e/ou pela reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa (RT-PCR).

2 – Material e Métodos

2.1 – Antecedentes - pacientes e espécimes clínicos

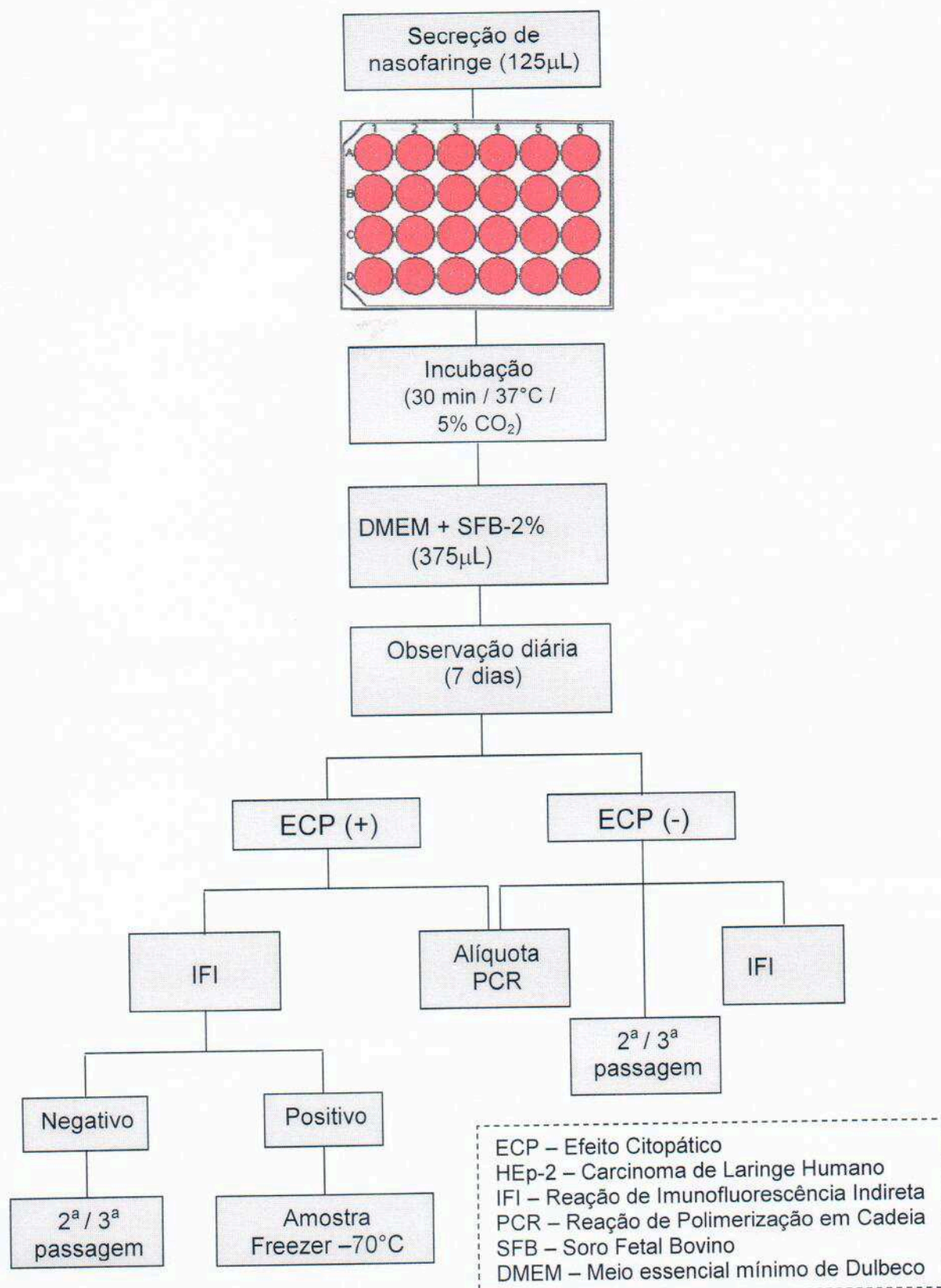
No período de abril de 2000 a março de 2002, 171 amostras de secreção de nasofaringe coletadas de crianças de 0-5 anos de idade, com doença respiratória aguda, no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), após consentimento expresso dos pais ou responsável (Apêndice-1), foram triadas pela reação de imunofluorescência indireta (IFI) para detecção de vírus respiratórios. Dessas, 38 amostras foram positivas para o VRS, constituindo-se no objeto deste estudo. A coleta desses espécimes clínicos foi aprovada pela Comissão de Ética da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFU, atendendo à resolução nº 196/1996.

Os espécimes foram coletados após a instilação de 0,5mL de soro fisiológico estéril (0,9%), em cada uma das narinas da criança, seguida de aspiração da secreção de nasofaringe com um cateter, utilizando-se um sistema de vácuo, e transferência para um frasco estéril. As amostras clínicas "in natura" foram imediatamente transportadas, em gelo, para o laboratório de Virologia onde foram processadas, em até 4 horas após a coleta, e armazenadas em freezer -70°C ou em container de nitrogênio líquido, conforme previamente descrito (QUEIROZ 1999; QUEIROZ et al., 2002).

2.2 – Isolamento em cultura de células (Fluxograma 1)

Os espécimes de nasofaringe, previamente triados pela IFI neste laboratório (CARVALHO et al., 2002) e armazenados com meio de congelamento (DMEM-40% + SFB-50% + gelatina-10%) em freezer -70°C , foram inoculados, uma única vez,

Fluxograma 1 – Isolamento do VRS em Cultura de Células (CC)



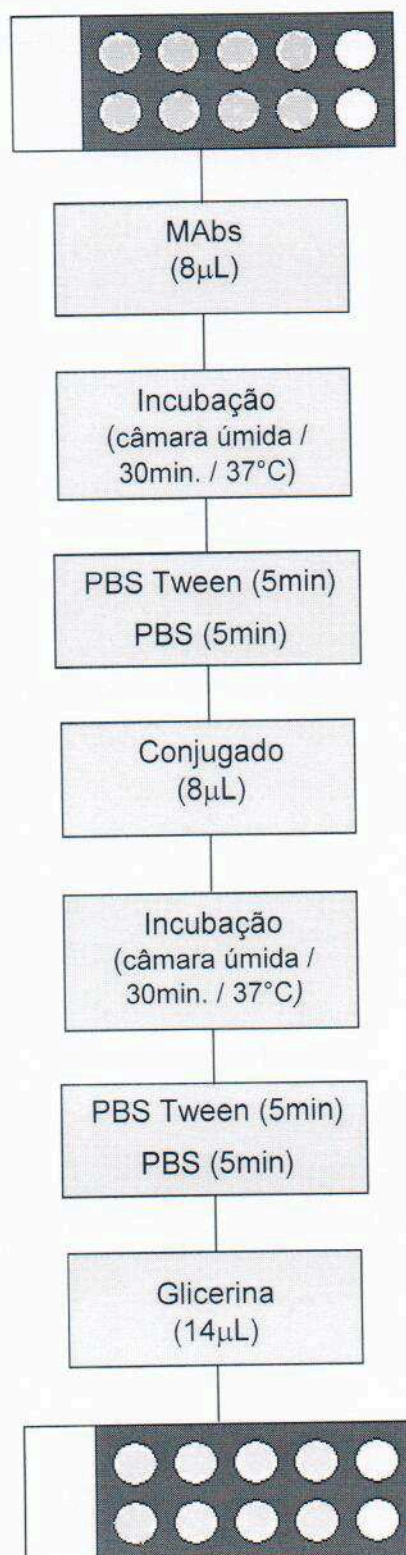
em linhagem contínua de células HEp-2, provenientes de carcinoma de laringe humano (ATCC CCL-23), para fins de isolamento do VRS, conforme Queiroz et al. (2002). Resumidamente, um volume de 125µL do aspirado de nasofaringe foi inoculado em duas ou mais monocamadas sub-confluentes de células HEp-2 crescidas em microplacas de poliestireno de 24 orifícios. Após 30 minutos de incubação (37°C/5% CO₂—câmara úmida), para a adsorção viral, foram acrescentados 375µL de meio completo (DMEM + SFB-2%), incubando-se a placa novamente nas condições acima descritas. Uma observação diária foi realizada durante 7 dias e, quando nenhum efeito citopático (ECP) foi detectado, as amostras foram sub-cultivadas em mais duas passagens, para confirmação da negatividade. A prova de IFI para confirmar a positividade ou negatividade para o VRS foi realizada, tanto para as culturas que apresentaram ECP como para as que não apresentaram.

2.3 – Reação de imunofluorescência indireta (Fluxograma 2)

As amostras provenientes do isolamento em cultura de células HEp-2 foram centrifugadas (166 x g) durante 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes em PBS (Phosphate-Buffered Saline) 0,01M (pH 7,2). Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspensão em 100µL de PBS, sendo que 8µL dessa suspensão foram colocados nos anéis delimitados por teflon de 2 lâminas, uma para triagem e a outra para a confirmação do isolamento do VRS. As lâminas foram secadas dentro do fluxo laminar e o sedimento foi fixado com acetona gelada por 10 minutos. Não sendo possível a execução imediata do teste, as lâminas foram armazenadas a -20°C até que a investigação pudesse ser realizada.

Na reação, as amostras foram tratadas com uma mistura de anticorpos monoclonais (MAbs) anti-vírus respiratórios do *Respiratory Panel I Viral Screening and Identification Kit* (Chemicon International, Inc., Temecula, CA), conforme instruções do fabricante. Os reagentes foram gentilmente cedidos pelo Dr. Dean Erdman do "Centers for Disease Control and Prevention"-CDC, Atlanta, GA. Resumidamente, foi utilizado uma mistura de 7 MAbs anti-vírus respiratórios (VRS, influenza A, influenza B, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3 e adenovirus), além de soro normal de camundongo como controle negativo da

Fluxograma 2 – Reação de imunofluorescência indireta (IFI)



MAbs – Anticorpos monoclonais
PBS – "Phosphate-Buffered Saline"

reação. Para revelar a reação foi utilizado um conjugado anti-imunoglobulina G (IgG) de camundongo, marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), sendo a leitura realizada no Laboratório de Imunologia, em microscópio de epi-fluorescência (Olympus BX50). Quando o resultado foi positivo na triagem, procedeu-se a identificação do VRS, utilizando MAb específico para esse vírus. O espécime foi considerado positivo quando pelo menos uma célula apresentar fluorescência específica para o VRS; negativo se nenhuma fluorescência específica foi observada.

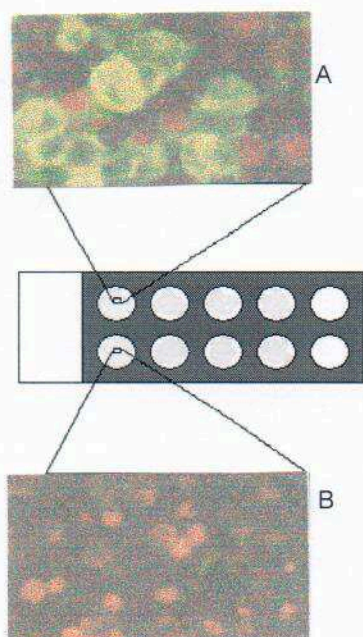
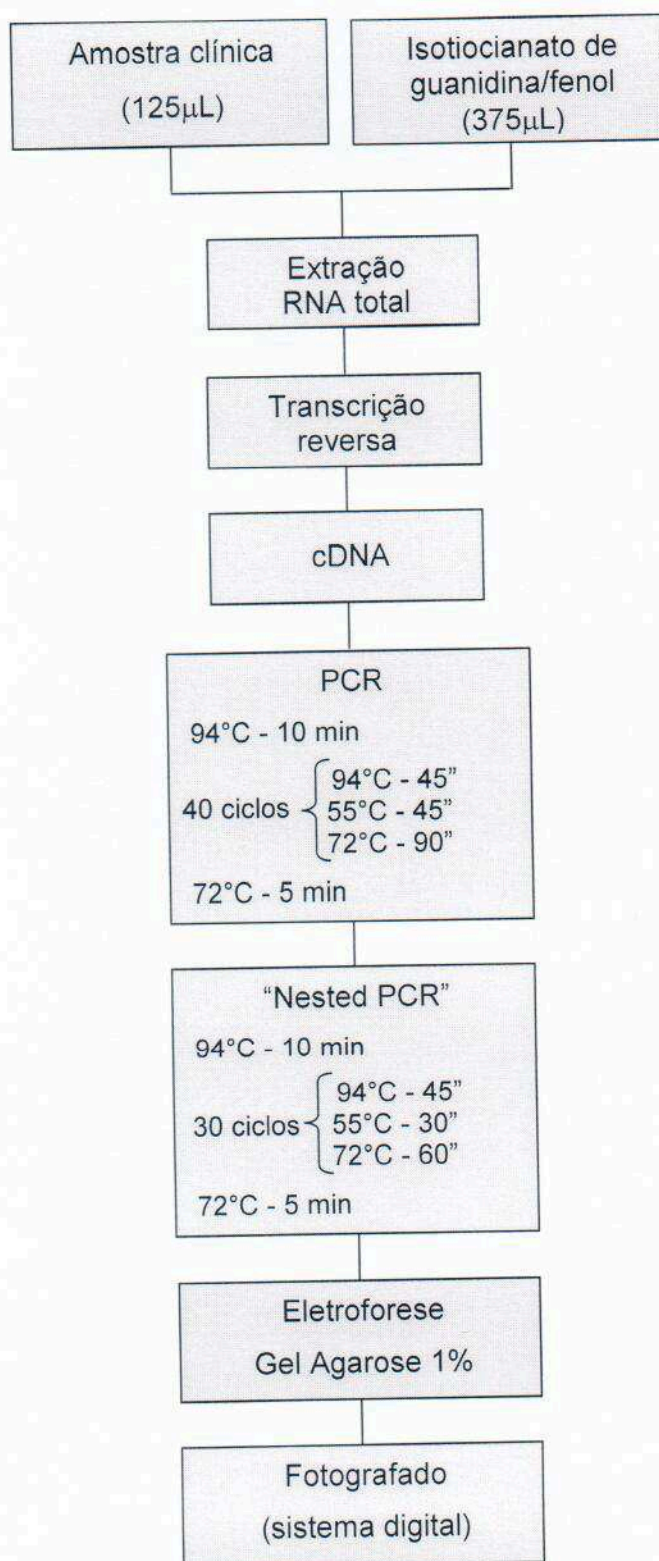


Figura 1 - Fotografias de uma reação de imunofluorescência indireta (objetiva 20X). A: confirmação do isolamento do VRS (amostra A62); B: controle negativo da reação

2.4 – Extração de ácidos nucléicos totais (Fluxograma 3)

Os ácidos nucléicos totais das amostras utilizadas neste estudo foram extraídos de acordo com o método de isotiocianato de guanidina/fenol (Tripure, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN - EUA), utilizando-se de um volume de 125 μ l da amostra clínica "in natura" e 375 μ l de Tripure. Com este método, foi possível o isolamento de RNA's, que foram utilizados na amplificação de seqüências virais.

Fluxograma 3 – Transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase
(RT-PCR)



cDNA – DNA complementar

2.5 – Reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa

O RNA viral foi primeiramente convertido em DNA complementar (cDNA), de acordo com o descrito por Gröndahl et al. (1989), através do uso dos seguintes reagentes: "random primers" (hexanucleotídeos, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) (gentilmente enviados pelo Setor de Vírus Respiratórios do CDC - seqüências não fornecidas), 0,25mM de cada desoxirribonucleotídeo (PCR nucleotide mix. Roche Molecular Biochemical's, Indianapolis, IN), 40U de transcriptase reversa de M-MuLV (Roche Molecular Biochemical's, Indianapolis, IN), 20U de inibidor de ribonuclease (Roche Molecular Biochemical's, Indianapolis, IN) e tampão - fornecido pelo fabricante da enzima - em 20 μ L de volume de reação. A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora em banho-maria. As reações de amplificação por PCR foram realizadas com 5 μ L do cDNA, 0,2mM de dNTPs conjunto (dATP, dTTP, dCTP e dGTP. Roche), 0,4 μ L de cada "primer" e 2,5U de Taq DNA polimerase (Roche) e tampão - fornecido pelo fabricante da enzima - em um volume final de 50 μ L.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 94°C por 10min., seguido de 40 ciclos de 94°C por 45seg., 50°C por 45seg., 72°C por 1min. e 30seg., seguidos de outro passo a 72°C por 5min. Já as reações de "Nested PCR" foram realizadas de acordo com os seguintes passos: 94°C por 10min., 30 ciclos de 94°C por 45seg., 55°C por 30seg., 72°C por 1min., seguidos de outro passo a 72°C por 5 minutos.

2.6 – Detecção dos produtos amplificados

Um volume de 5 μ L do produto gerado pela reação de amplificação foi misturado com 1 μ L de "gel-loading buffer" 6X (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Essa mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,3 μ g/mL), até que o azul de bromofenol migrasse cerca de 3cm. O gel foi fotografado por um sistema digital (ImageMaster VDS. Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

2.7 – Análise estatística / tabulação dos dados

A análise estatística dos resultados foi realizada conforme previamente descrito (GUIMARÃES, 1985). Para os cálculos estatísticos, os resultados foram tabulados de acordo com o seguinte esquema:

		Teste 2		
		Positivo	Negativo	
Teste 1	Positivo	a Verdadeiros positivos	b Falsos negativos	a + b Total de positivos
	Negativo	c Falsos Positivos	d Verdadeiros negativos	c + d Total de negativos
		a + c Total de positivos	b + d Total de negativos	Total geral

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a + b} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{c + d} \times 100$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

3 – Resultados e Discussão

3.1 – Características dos pacientes

A tabela 1 mostra as características das 38 crianças, com doença respiratória aguda, atendidas no Hospital de Clínicas da UFU, que participaram deste estudo no período de março de 2000 a abril de 2002. Com relação à faixa etária, aproximadamente 30% (12/38) dos casos tinham menos de seis meses de idade e 50% (19/38) deles eram menores de um ano de idade.

Em relação ao sexo, no grupo de crianças <1-6 meses de idade a infecção aguda pelo VRS foi aparentemente mais elevada nos indivíduos do sexo masculino do que no feminino, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). Em contrapartida ao observado, estudos têm mostrado que indivíduos do sexo masculino apresentam maior tendência de desenvolver severidade no primeiro

Tabela 1 - Características das 38 crianças menores de cinco anos de idade, atendidas no Hospital de Clínicas da UFU, Uberlândia-MG, no período de março de 2000 a abril de 2002, com doença respiratória aguda.

Idade ^a	Total N (%)	Sexo		Doença		Procedência		
		Masculino N (%)	Feminino N (%)	TRS ^b	TRI ^c	PAP ^d	PS ^e	UTI- Ped ^f
< 1 – 6	12 (31,6)	7 (58,3)	5 (41,7)	1 (8,3)	11 (91,7)	2 (16,7)	6 (50,0)	4 (33,3)
6 – 12	7 (18,5)	3 (42,9)	4 (57,1)	4 (57,1)	3 (42,9)	5 (71,4)	1 (14,3)	1 (14,3)
> 12	19 (49,9)	9 (47,4)	10 (52,6)	11 (57,9)	8 (42,1)	14 (73,7)	4 (21,0)	1 (5,3)
Total	38 (100,0)	19 (50,0)	19 (50,0)	16 (42,1)	22 (57,9)	21 (55,3)	11 (28,9)	6 (15,8)

^a Idade em meses; N: número de indivíduos; ^bTRS: trato respiratório superior, ^cTRI: trato respiratório inferior, ^dPAP: pronto atendimento pediátrico, ^ePS: pronto-socorro, ^fUTI-Ped unidade de terapia intensiva pediátrica

ano de vida (PARROT et al., 1973; HOLBERG et al., 1991; COLOCHO ZELAYA et al., 1994; QUEIROZ et al., 2002). Entretanto, apesar de cerca de 90% (11/12) das crianças desse grupo ter apresentado doença do trato respiratório inferior e, de metade dos casos ter sido atendido no pronto socorro, muitos deles não apresentavam severidade suficiente pra justificar a hospitalização (comunicação pessoal médica) e, portanto, receberam "altas" para voltar para casa.

Observa-se ainda, que do total de 38 crianças, 22 (57,9%) apresentavam doença do trato respiratório inferior, sendo que metade delas (11/22) era menor de seis meses de idade. Essa observação está de acordo com o conhecimento de que o VRS é o principal agente etiológico da bronquiolite e da pneumonia viral em crianças <1-6 meses de idade (KIM et al., 1973; NASCIMENTO et al., 1991; QUEIROZ et al., 2002), respondendo por elevados índices de morbidade nessa faixa etária.

3.2 – Isolamento em cultura de células

Das 38 amostras inoculadas em células HEp-2 só foi possível isolar o VRS de 44,7% (17/38) delas (Figura 1). Este resultado diferiu dos observados por Halstead et al. (1990) e por Kellogg et al. (1991), que demonstraram uma sensibilidade de 57–90% para o isolamento em cultura de células em relação à outras técnicas. Porém, nesta pesquisa inoculou-se amostra clínica previamente armazenada com meio de congelamento e sabe-se, através de comunicações pessoais de outros investigadores, que o inóculo da amostra "in natura" aumenta a chance de isolar o VRS. Somado a isso, foi realizada uma única tentativa de isolamento, fato este, decorrente da falta de filtros 0,45µL para filtrar essas amostras antes da inoculação em CC.

Por outro lado, os resultados deste estudo foram coincidentes com os observados por Cassiano-Cólon et al. (2003) que isolaram o VRS em células HEp-2 de 46% dos espécimes. Entretanto, a investigação realizada por esses pesquisadores foi feita a partir de amostras clínicas de pacientes adultos.

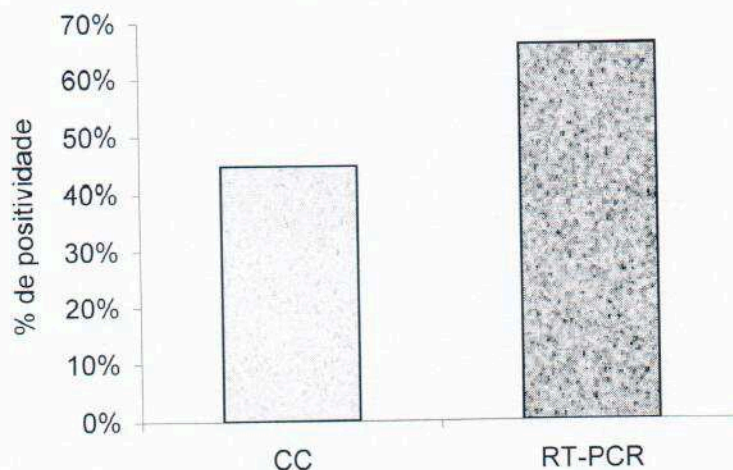


Figura 3: Detecção do VRS através do isolamento em CC ou RT-PCR em 38 amostras clínicas previamente triadas por IFI

Outra possibilidade para a pequena sensibilidade do isolamento em CC, seria o fato de que a linhagem de células HEp-2, utilizada, poderia ter perdido, durante a propagação seriada no laboratório, parte da sensibilidade para isolar e/ou permitir o desenvolvimento do VRS (COLLINS et al., 1996). Além disso, sabe-se que os manuseios de amostras clínicas, durante o processamento e o armazenamento, são responsáveis pela rápida perda da capacidade infecciosa de partículas do VRS (FERNIE; GERIN, 1982; COLLINS et al. 1996).

3.3 – Reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa

Considerando a impossibilidade de realizar, num tempo curto, novas tentativas de isolamento em CC e o fato de a PCR ser considerada de maior sensibilidade ou, pelo menos, de igual sensibilidade à CC (KEHL et al., 2001; LIOLIOS et al., 2001; SIMPSON et al., 2003), optou-se por realizar a reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa, que resultou no isolamento do ácido nucléico desse vírus em 25 (65,8%) das 38 amostras (Figura 1), conforme demonstrado em duas reações (Figura 2).

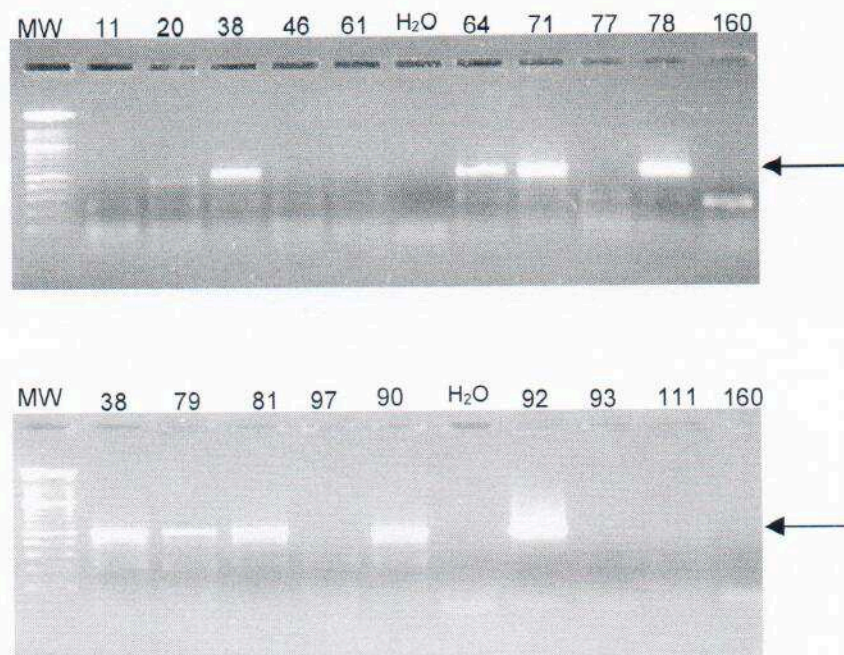


Figura 2 - Detecção do VRS por RT-PCR. MW: marcador de peso molecular; amostra 38: controle positivo; H₂O: controle negativo de contaminação; amostra 160: controle negativo da reação

A detecção do VRS em cerca de 66% (25/38) das amostras (Quadro 1), de secreção respiratória previamente triadas por IFI, através do isolamento em CC ou pela RT-PCR, sugere a ocorrência de resultados falso-positivos pela IFI. Entretanto, além das possíveis justificativas já discutidas, deve-se lembrar, conforme referido (TREPANIER et al., 1980; CANNON 1987; COLLINS et al., 1996), que a reação de imunofluorescência constitui o método de escolha para a detecção do VRS em secreção, havendo, porém, a necessidade de uma interpretação apurada do observador durante a leitura do teste (CASSIANO-COLON et al., 2003). Neste aspecto, ressalta-se aqui que no período da triagem destas amostras a leitura da IFI foi realizada por três diferentes observadores.

Por outro lado, também pode ter ocorrido uma distribuição desigual, de partículas virais, em alíquotas (XIANG et al. 2002) no ato do processamento da amostra original.

Quadro 1: Número de amostras do VRS isoladas em CC em relação à RT-PCR: indicadores de validade dos testes

		Isolamento em CC		Indicadores de validade
		Positivo	Negativo	
RT-PCR	Positivo	17	8	25
	Negativo	0	13	13
		17	21	38

S = sensibilidade; E = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPB = valor preditivo negativo

O cálculo da sensibilidade e da especificidade, do isolamento em CC, foi realizado para as 38 amostras submetidas à RT-PCR, conforme mostrado no Quadro 1. Observa-se que pela RT-PCR foi possível aumentar em, aproximadamente, 20% o número de amostras positivas para o VRS.

3.4 – Considerações finais

O fato de o Laboratório de Virologia ter sido recém-implantado pode, também, ter interferido nos resultados de IFI, pois a coleta e o processamento dos espécimes também foram realizados por diferentes alunos (graduação e pós-graduação), o que pode ter acarretado numa diluição inadequada dos espécimes no momento da coleta e/ou do processamento dos mesmos. Somado a isso, ainda há o fato de que para o processamento, dos primeiros espécimes, utilizou-se de equipamentos localizados em outros laboratórios.

Finalmente, considerando que os testes de isolamento em CC e RT-PCR foram realizados uma única vez, pode ser que o número de amostras falso-positivas pela IFI, na seleção dos 38 espécimes, tenha sido superestimado.

Diante do exposto, propõe-se que novas tentativas de isolamento em cultura de células e de reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa a partir de amostras “in natura” sejam realizadas, pois se acredita, que isso vai aumentar o número de amostras de VRS isoladas por estes métodos.

¹Referências Bibliográficas:

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. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.161, n.4, p.640-646, 1990.

ANDERSON, L. J.; HENDRY, R. M.; PIERIK, L. T.; TSOU, C.; McINTOSH, K. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.163, n.4, p.687-92, 1991.

CANE, P. A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. **Reviews in Medical Virology**, Chichester, v.11, p.103-116, 2001.

CANNON, M. J. Microplaque immunoperoxidase detection of infectious respiratory syncytial virus in the lungs of infected mice. **Journal of Virology**, Washington, v.16, p.293-301, 1987.

CARVALHO, C. B.; YOKOSAWA, J.; DURIGON, E. L.; OLIVEIRA, T. M.; MANTESE, O. C.; SILVEIRA, H. L.; LIMA, A. C.; COSTA, L. F.; QUEIROZ, D. A. O. Circulation of respiratory syncytial vírus and other respiratory viruses in children nasopharyngeal specimens in 2001 in Triângulo Mineiro, MG. In VIRUS, REVIEWS & RESEARCH, 13. 2002. **Resumo (PY 2)**, Águas de Lindóia, 2002.

CASIANO-COLÓN, A. E.; HULBERT, B. B.; MAYER, T. K.; WALSH, E. E.; FALSEY, A. R. Lack of sensitivity of rapid antigen test for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v.00, p.1-6, 2003.

CHANDWANI, S.; BORKOWSKY, W.; KRASINSKI, K.; LAWRENCE, R.; WELLIVER, R. Respiratory syncytial virus infection in human immunodeficiency virus-infected children, **Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v.117 (2Pt1), p.251, 1990.

¹Referências Bibliográficas de acordo com o padrão da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002.

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 children. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v.66, p.291-300, 1957.

COLLINS, P. L.; MCINTOSH, K.; CHANOCK, R. M. Respiratory syncytial virus. In: **Virology**. Third Edition, vol. 1. Eds. B. N. Fields; D. M. Knipe; P. M. Howley. Philadelphia, New York, Lippincott-Raven Publishers, p. 1313 – 1351, 1996.

COLOCHO ZELAYA, E. A. C.; PETTERSSON, C. A.; FORSGREN, M.; ORVELL, C.; STRANNEGARD, O. Respiratory syncytial virus infection in hospitalized patients and healthy children in el Salvador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.51, n.5, p.577-584, 1994.

DOMACHOWSKE, J. B. & ROSENBERG, H. F. Respiratory Syncytial Virus Infection: Immune Response, Immunopathogenesis, and Treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12, n.2, p.298-309, 1999.

FERNIER, B. F.; GERIN, J. The stabilization and purification of respiratory syncytial virus using MgSO₄. **Virology**, New York, v.106, p.141-144, 1982.

GIMENEZ, H. B.; HARDMAN, N.; KEIR, H. M.; CASH, P. Antigenic variation between human respiratory syncytial virus isolates. **Journal of General Virology**, London, v.67, p.863-870, 1986.

GLEZEN, W. P.; DENNY, F. W. Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.288, n.10, p.498-505, 1973.

GLEZEN, W. P.; PAREDES, A.; ALLISON, J. E.; TABER, L. H.; FRANK, A. L.; Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, Sex, ethnic group, and maternal antibody level. **Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v.98, n.5, p.708-715, 1981.

GROOTHUIS, J. R.; GUTIERREZ, K. M.; LAUER, B. A. Respiratory syncytial virus infection in children with bronchopulmonary dysplasia. **Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v.82, n.2, p.199-203, 1988.

GRONDAHL, B.; PUPPE, W.; HOPPE, A.; KÜHNE, I.; WEIGL, J. A. I.; SCHMITT, H. J.; Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.1, p.1-7, 1989.

GUIMARÃES, M. C. S. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivos positivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.18, n.2, p.117-120, 1985.

HALL, C. B.; POWELL, K. R.; MacDONALD, N. E.; GALA, C. L.; MENEGUS, M. E.; SUFFIN, S. C.; COHEN, H. J. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.315, n.2, p.77-81, 1986.

HALL, C. B.; WALSH, E. E.; LONG, C. E.; SCHNABEL, K. C. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.163, n.4, p.693-698, 1991.

HALSTEAD, D. C.; TODD, S.; FRITCH, G. Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus detection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.28, n.5, p.1021-1025, 1990.

HENDERSON, F. W.; CLYDE, W. A.; COLLIER, A. M.; DENNY, F. W.; SENIOR, R. J.; SHEAFFER, C. I.; CONLEY, W. G.; CHRISTIAN, R. M. The etiologic and epidemiologic spectrum of bronchiolitis in pediatric practice. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.95, n.2, p.183-190, 1979.

HOLBERG, C. J.; WRIGHT, A. L.; MARTINEZ, F. D.; RAY, C. G.; TAUSSIG, L. M.; LEBOWITZ, M. D.; Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.133, n.11, p.1135-51, 1991.

JOHANSEN, J.; CHRISTENSEN, L. S.; HORNSLETH, A.; KLUG, B.; HANSEN K. S. Nir M. Restriction pattern variability of respiratory syncytial virus during three consecutive epidemics in Denmark. **APMIS**, Copenhagen, v.105, n.4, p.303-8, 1997.

KEHL S. C.; HENRICKSON K. J.; HUA W; FAN, J. Evaluation of the hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, p.1696-1701, 2001.

KELLOGG, J. A. Culture vs direct antigen assays for detection of microbial pathogens from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago, v.115, p.451-458, 1991.

KIM, H. W.; ARROBIO, J. O.; BRANDT, C. D.; JEFFRIES, B. C.; PYLES, G.; REID, J. L.; CHANOCK, R. M.; PARROT, R. H. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. II. Importance of the virus in diferents respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infections. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.98, n 3, p.216-225, 1973.

LIOLIOS, L.; JENNEY A.; SPELMAN, D.; KOTSIMBOS, T.; CATTON, M. WESSELINGH, S. Comparison of a multiplex reverse transcription-pcr-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and imunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39,p.2779-83, 2001.

MACDONALD, N. E.; HALL, C. B.; SUFFIN, S. C.; ALEXSON, C.; HARRIS, P. J.; MANNING, J. A. Respiratory syncytial viral infection in infants with congenital heart disease. **New England Journal Medicine**, Waltham, v.307, n.7, p.397-400, 1982.

MIYAO, C. R.; GILIO, A. E.; VIEIRA, S.; HEIN, N.; PAHL, M. M. C.; DETTA, S. L.; DURIGON, E. L.; STEWIEN, K. E.; QUEIROZ, D. A. O.; BOTOSO, V. F.; GOMES, M. C. S.; LOPES, C. L. B. C.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Infecções virais em crianças internadas por doença aguda do trato respiratório inferior. **Jornal de Pediatria**, São Paulo, v.75, n.5, p.334-344, 1999.

MORRIS, J. A. Jr; BLOUNT, R. E.; SAVAGE, R. E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v.92, p.544-550, 1956.

MUFSON, M. A.; ORVELL, C.; RAFNAR, B.; NORRBY, E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, London, v.66, p.2111-2124, 1985.

NASCIMENTO, J. P.; SIQUEIRA, M. M.; SUTMOLLER, F.; KRAWCZUK, M. M.; FARIAS, V. de.; FERREIRA, V.; RODRIGUES, M. J. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.33, n.4, p.287-296, 1991.

OTTOLINI, M. G.; HEMMING, V. G. Prevention and treatment recommendations for respiratory syncytial virus infections. Background and clinical experience 40 years after discovery. **Drugs**, Sydney, v.54, n.6, p.867-884, 1997.

PAN AMERICAN HEALTHY ORGANIZATION; WORLD HEALTHY ORGANIZATION; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVETION. **Diagnosis of Influenza and ather respiratory viruses**. Santiago: [s.n.], 165p. Apostila. Apr. 1997.

PAN AMERICAN HEALTHY ORGANIZATION; WORLD HEALTHY ORGANIZATION; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVETION. **Diagnosis of Influenza and ather respiratory viruses**. Santiago: [s.n.], 165p. Apostila. Apr. 1999.

PARROTT, R. H.; KIM, H. W.; ARROBIO, J. O.; HODES, D. S.; MURPHY, B. R.; BRANDT, C. D.; CAMARGO, E.; CHANOCK, R. M. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.98, n 4, p.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. **Journal of General Virology**, London, v.79, p.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 group A and B Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes in 5 Communities in North America. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.181, p.1891-1896, 2000.

QUEIRÓZ, Divina Aparecida Oliveira. Características da resposta imune ao vírus respiratório sincicial (VRS) em espécimes de crianças lactentes, durante as fases aguda e/ou convalescentes. 1999. 116f. Tese (Doutorado em Ciências, área de Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

QUEIRÓZ, D. A. O.; DURIGON, E. L.; BOTOSO, V. F.; EJZEMBERG, B.; VIEIRA, S. E.; MINEO, J. R.; YAMASHITA, C.; HEIN, N.; LOPES, C. L.; CACHARO, A. L.; STEWIEN, K. E. Immune response to respiratory syncytial vírus in Young Brazilian children. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.35(10), p.1183-1193, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL D. W. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EUA, 2001.

SIMPSON, J. L.; MORIC, I.; WARK, P. A. B.; JOHNSTON S. L.; GIBSON, P. G. Use of induced sputum for the diagnosis of influenza and infections in asthma: a

comparasion of diagnostic techniques. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v.26, p.339-346, 2003.

SULLENDER, W. M. Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v 13, n1, p.1-15, 2000.

TREPANIER, P.; PAYMENT, P.; TRUDEL, M. A simple and rapid microassay for the titration of human respiratory syncytial virus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v 1, p 343-347, 1980.

VIEIRA, S. E.; STEWIEN, K. E.; QUEIRÓZ, D. A. O.; DURIGON, E. L.; TOROK, 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. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.43, n.3, p.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 Virus Infection in Adults: use of a Single-Tube "Hanging Droplet" Nested PCR. **Journal of Medical Virology**, New York, v.63, p.259-263, 2001.

XIANG, X.; QIU, D.; CHAN, K. P.; CHAN, S. H.; HEGELE, R. G.; TAN, W. C. Comparison of three methods for respiratory virus detection between induced sputum and nasopharyngeal aspirate specimens in acute asthma. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.101, p.127-133, 2002.

APÊNDICE 1

Deteção rápida de vírus respiratórios em amostras de crianças de 0-5 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro, MG.

Local: Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Sr. Pais/ Responsáveis,

Solicitamos sua autorização para coleta de material – secreção das narinas e sangue de seu filho para pesquisar o agente viral responsável pela doença respiratória aguda que acomete crianças, principalmente na idade até os cinco anos.

A deteção do agente viral que está causando a infecção em seu filho poderá auxiliar o médico a tratá-lo e também fornecer informações científicas a respeito da circulação dos principais vírus respiratórios em nossa região.

Se a coleta deste material for do seu consentimento, favor assinar este documento.

Uberlândia: ____/____/____

Nome do pai (mãe) ou responsável: _____

Assinatura: _____

Médicos colaboradores/responsáveis: _____

Profs. Drs. Orlando Cesar Mantese e Hélio Lopes da Silveira

Coordenadora do Projeto:

Profa. Dra. Divina A. O. Quieróz

