

RENATO DOS REIS OLIVEIRA

**Padronização e comparação de técnicas de reação
em cadeia por polimerase (PCR) para detecção do
metapneumovírus humano em secreções respiratórias**

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

Área de Concentração: Doenças Infecciosas
e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti

São Paulo

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÓRIA

A meus pais, Maria Emília e Vítor, e a meu irmão Rodrigo,
Mestres em minha vida.

À Dália Reis.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Dr. Cláudio Pannuti, minha imensa gratidão pelos ensinamentos, confiança, dedicação e amizade que perdurarão para sempre em meus pensamentos.

À Dra. Clarisse Machado, pela idealização do projeto, ajuda e compreensão que muito contribuíram e estimularam a realização desse projeto.

Aos meus familiares e amigos, pelo acolhimento, pelo carinho e pela confiança no meu trabalho.

À minha amiga e companheira Fernanda, pelo carinho e pela presença constante nos bons e maus momentos de minha vida.

Aos meus amigos José de Paula, Adriana Machado, Alexandra Dias e Michela Gabriele, pela amizade, convívio e apoio na construção desse projeto e pelo enriquecimento do meu dia-a-dia.

Ao Dr. José Eduardo Levi, Adriana Tateno, Lucy Vilas Boas, Laura Sumita, Cíntia Canto e Maria Cristina Fink pela amizade e contribuições cruciais para a realização desse projeto.

A todos os amigos e colegas do Instituto de Medicina Tropical da USP, por fazerem do nosso laboratório a minha segunda casa.

Ao Professor Dr. Edison Durigon e Daniela do ICB, ao Dr. Paulo Cotrim e Sueli do LIM-48, pelas orientações e apoio técnico.

À Dra. Tereza Peret e a Dra. Vivian Luchsinger pelo fornecimento de dados e materiais.

Ao Professor Dr. Aluísio Segurado pelo incentivo e revisão do trabalho.

Às secretarias Rosemeire Aparecida Moraes Ribeiro e Roseli Antônia Santo.

À Maria Iranides Santana de Oliveira e Almir Robson Ferreira.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo
Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Histórico.....	2
1.2. Características virológicas do hMPV.....	2
1.3. Classificação do vírus.....	3
1.4. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo hMPV.....	5
1.5. Aspectos clínicos relacionados à infecção pelo hMPV.....	9
1.6. Diagnóstico da infecção por hMPV.....	10
1.7. Padronização de técnicas de biologia molecular para detecção do hMPV.....	14
1.8. Infecção por hMPV no Brasil.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	20
4. METODOS.....	22
4.1. Amostras de secreção respiratória.....	23
4.2. Padronização de técnicas de PCR para detecção do hMPV.....	24
4.2.1. Isolamento viral - obtenção de amostras de controle de hMPV.....	25
4.2.2. Extração de RNA total das amostras.....	26
4.2.3. Transcrição reversa.....	28
4.2.4. Clonagem em bactérias recombinantes.....	30
4.2.5. Padronização das reações em cadeia por polimerase (PCR).....	32
4.2.5.1. Padronização da PCR convencional.....	32
4.2.5.2. Padronização da PCR em tempo real.....	38
4.2.6. Seqüenciamento das amostras positivas à detecção de RNA do hMPV..	41
4.3. Comparação entre as técnicas de PCR.....	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1. Padronização de técnicas de PCR para detecção do hMPV.....	44
5.1.1. Padronização da PCR convencional.....	44
5.1.2. Padronização da PCR em tempo real.....	52
5.2. Comparação entre as técnicas de PCR.....	57
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÕES.....	67
8. ANEXOS.....	69
9. REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE	

RESUMO

A reação em cadeia por polimerase (PCR) e suas variantes tem sido, desde o isolamento do metapneumovírus humano (hMPV), a técnica mais utilizada para a detecção do vírus em secreções respiratórias de diferentes grupos de pacientes. Entretanto, a interpretação de estudos abordando aspectos epidemiológicos e patogênicos da infecção pelo hMPV tem sido dificultada pelo uso de uma grande variedade de técnicas de PCR “in house” na ausência de uma técnica “padrão ouro” claramente definida. A avaliação da sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade de qualquer técnica molecular “in house” é um passo crucial para podermos comparar estudos realizados por diferentes grupos de pesquisa e diferentes grupos de pacientes. Este estudo teve como objetivos a padronização de duas técnicas de PCR – convencional e em tempo real – para a detecção do hMPV em secreções respiratórias e a avaliação da concordância existente entre as técnicas. Entre 228 amostras de lavado de nasofaringe coletadas de receptores de transplante de células tronco hematopoiéticas com sintomas de infecção respiratória aguda, 10 (4,4%) foram positivas para a presença do hMPV pela técnica de PCR convencional enquanto que 11 (4,8%) foram positivas pela técnica de PCR em tempo real. A concordância entre as técnicas, medida pelo índice Kappa para um intervalo de confiança de 95%, foi de 0,95, ou seja, quase perfeita.

Descritores: 1.Metapneumovírus humano/diagnóstico 2.Infecções respiratórias 3.Reação da cadeia da polimerase 4.Técnicas de diagnóstico e procedimento

SUMMARY

The polymerase chain reaction (PCR) has been, since the isolation of the virus in 2001, the most used technique for detection of human metapneumovirus (hMPV) in respiratory specimens of several groups of patients. However, the interpretation of studies regarding the epidemiology and pathogenesis of hMPV infection has been hindered by the use of a great variety of PCRs techniques for hMPV detection, in the absence of a clearly defined “gold standard”. The assessment of the sensitivity, specificity and reproducibility of any in-house molecular technique is a crucial step to allow the comparison of studies conducted in different settings and different groups of patients. The aim of the present study was to standardize two in-house PCR assays a conventional PCR and a real-time PCR for detecting hMPV in nasopharyngeal aspirates and to evaluate the agreement between the two assays. Of 228 samples of nasopharyngeal aspirates obtained from hematopoietic stem cell transplant recipients with acute respiratory symptoms, 10 (4.4%) were positive for hMPV by conventional PCR whereas 11 (4.8%) were positive by real-Time PCR. The agreement of both assays, measured by Kappa Index, was almost perfect (0.95, 95% confidence interval).

Descriptors: 1.Human metapneumovirus/diagnosis 2.Respiratory tract infections 3.Polymerase chain reaction 4.Diagnostic techniques and procedures

1.1. Histórico

Apesar do avanço no controle de diversas doenças infecciosas, em particular nos países desenvolvidos, as doenças respiratórias continuam a ser umas das principais causas de morte em todo o planeta.

Vírus de diferentes grupos podem causar tais doenças, sendo os vírus da influenza A e B e o vírus sincicial respiratório (VSR) considerados, atualmente, os mais importantes patógenos do trato respiratório (Fleming *et al*, 2000; Zambon *et al*, 2001). Contudo, outros vírus, nomeadamente o parainfluenza e o adenovírus, também podem causar infecções respiratórias graves (Treanor, 1997; Hall, 2001; Zambon *et al*, 2001).

Os resultados de vários estudos mostraram que um novo vírus respiratório descoberto recentemente, o metapneumovirus humano (hMPV), ocorre em cerca de 10% das infecções do trato respiratório em que não é detectada a presença de outros vírus, tais como o VSR, o vírus da influenza ou o vírus da parainfluenza (Kahn *et al*, 2003).

O hMPV foi inicialmente isolado por Van den Hoogen *et al*, em 2001, na Holanda, a partir de aspirados de nasofaringe coletados ao longo de vinte anos, em crianças que apresentavam doença do trato respiratório.

1.2. Características virológicas do hMPV

No relato inicial de Van den Hoogen *et al*, este novo agente etiológico foi identificado seguindo critérios específicos, a saber: análise morfológica por microscopia eletrônica, efeito citopático em células terciárias de rim de macaco (tMK), ausência de atividade hemaglutinante, infecção experimental do vírus em macacos e

aves e comparação filogenética com membros da sub-família *Pneumovirinae* (Van den Hoogen *et al*, 2001).

A microscopia eletrônica revelou que as partículas do hMPV são pleiomórficas, de diâmetro variável entre 150-600 nm e com pequenas projeções do envelope com média de comprimento de 15 nm (Van den Hoogen *et al*, 2001). Peret *et al*, em 2002, confirmaram ainda, pela mesma técnica, que o vírus possui um nucleocapsídeo com diâmetro médio de 17 nm – figura 1.

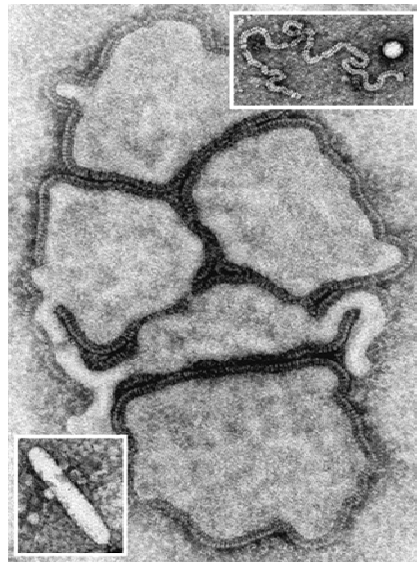


Figura 1: Ultramicrofotografia eletrônica do metapneumovírus humano. Imagem central: cinco partículas pleiomórficas do hMPV; imagem do canto superior direito: nucleocapsídeo; imagem do canto inferior esquerdo: partícula filamentososa. Fotografia: Dr. Charles Humphrey (Peret *et al*, 2002)

1.3. Classificação do vírus

De modo a obter a informação da seqüência genômica dos isolados do hMPV, Van den Hoogen *et al* (2001) desenvolveram uma reação em cadeia por polimerase conhecida por “RAP-PCR”. O RNA do vírus foi isolado a partir do

sobrenadante de culturas de células terciárias de rim de macaco (tMK) (Van den Hoogen *et al*, 2001).

Foram seqüenciados vinte diferentes segmentos genômicos do vírus comparando-os a seqüências do metapneumovírus de aves (APV), membro já conhecido da sub-família *Pneumovirinae*, e ao VSR. A análise das seqüências destes fragmentos confirmou a ausência das *Open Reading Frames* - ORFs - NS1 e NS2 no extremo 3' do genoma viral e as posições inversas das ORFs F/M2 em relação as ORFs SH/G, características que excluíram a possibilidade do vírus pertencer ao gênero *Pneumovirus*, ao qual pertence o VSR (figura 2).

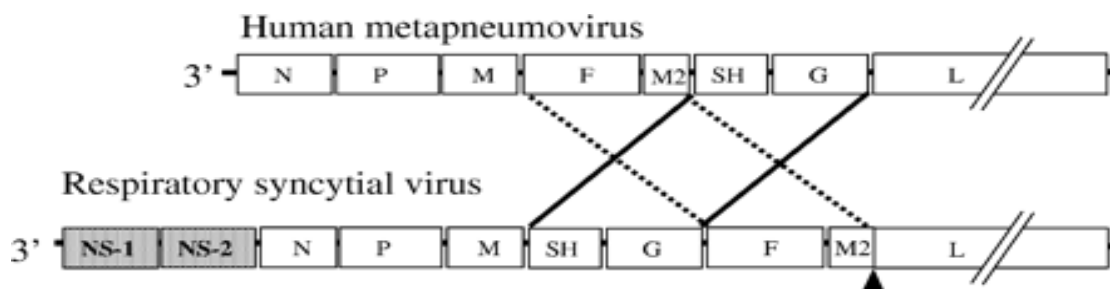


Figura 2: Mapas genômicos do hMPV e do RSV (família *Pneumovirinae*) dispostos na orientação 3'-5' (Kahn *et al*, 2006). No hMPV, os genes F e M2 localizam-se antes dos genes SH e G, enquanto no RSV as respectivas posições são inversas. O genoma do RSV codifica duas proteínas não-estruturais – NS-1 e NS-2 – que não estão presentes no genoma do hMPV. Human metapneumovirus: metapneumovírus humano; Respiratory syncytial vírus: vírus sincicial respiratório.

Por outro lado, dez dos vinte fragmentos mostraram similaridade com os diferentes genes que codificavam para regiões da nucleoproteína (N), proteína matriz (M), proteína de fusão (F) e proteína polimerase (L) do metapneumovirus aviário (Van den Hoogen *et al*, 2001).

Outros estudos comprovaram a elevada semelhança morfológica e genética do hMPV ao subtipo C do metapneumovírus de aves (APV), resultando na sua

classificação dentro da família *Paramixoviridae* e do gênero *Metapneumovirus* (Peret *et al*, 2002; Bastien *et al*, 2003). Por conseguinte, o hMPV é o primeiro do gênero *Metapneumovirus* responsável por causar doenças respiratórias em mamíferos (Van den Hoogen *et al*, 2001).

Van den Hoogen *et al* (2004) baseando-se em análises de seqüências do genoma do hMPV, concluíram que existem duas linhagens genéticas ou sub-grupos distintos do vírus – denominadas A e B – que podem por sua vez ser subdivididas em duas sub-linhagens – denominadas respectivamente por A1/A2 e B1/B2.

O fato de existirem diferenças genômicas entre os subgrupos A e B do hMPV realça a importância de se utilizar regiões conservadas do genoma viral para o desenho de *primers*, de modo a garantir que tais técnicas possam ser aplicáveis para todas as linhagens (Coté *et al*, 2003).

É importante salientar que os dois subgrupos apresentam reatividades sorológicas diferentes (Ebihara *et al*, 2004) e podem co-circular em diversos pontos geográficos (Stockton *et al*, 2002; Biacchesi *et al*, 2003 ;Viazov *et al*, 2003).

1.4. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo hMPV

A partir do relato inicial de Van den Hoogen *et al*, em 2001, grande parte dos trabalhos realizados com o hMPV rastrearam a presença do vírus em amostras respiratórias de crianças, provenientes de diversos continentes, entre os quais a Europa (Brueggemann *et al*, 2003; Maggi *et al*, 2003; Zakay-Rones *et al*, 2003; Viazov *et al*, 2003), Oceania (Nissen *et al*, 2002), Ásia (Peiris *et al*, 2003; Thanasugarn *et al*, 2003), América do Norte (Esper *et al*, 2003; Williams *et al*, 2004) e América Latina (Cuevas *et al*, 2003; Galiano *et al*, 2004; Luchsinger *et al*, 2004).

Além da sua importante presença em indivíduos jovens, o hMPV, tal como o VSR, também pode causar infecção respiratória em outros grupos etários, nomeadamente em adultos, idosos e pacientes imunocomprometidos.

Ao pesquisar a presença do hMPV em amostras respiratórias de adultos sintomáticos hospitalizados com idades inferiores a 65 anos de idade, Falsey *et al* (2003) concluíram que a prevalência do hMPV foi de 4,5%. Outros estudos também visaram a pesquisa do hMPV nesta população, mostrando que o vírus é responsável por infecções respiratórias em indivíduos de diversas faixas etárias (Stockton *et al*, 2002; Boivin *et al*, 2002).

O hMPV pode causar doenças respiratórias significativas na população idosa. Aproximadamente metade dos 37 pacientes analisados em estudo em Quebec, no Canadá, possuía idades superiores a 65 anos. Febre, tosse e dispnéia eram os sintomas mais comuns apresentados pelos pacientes (Boivin *et al*, 2002).

Falsey *et al* (2003) em estudo prospectivo que incluiu duas séries de casos de pacientes com sintomas respiratórios, uma de adultos e outra de idosos, avaliaram a prevalência do HMPV durante duas épocas de inverno consecutivas. Num total de 984 casos de doença do trato respiratório, 4,5% foram associados ao hMPV. As infecções pelo vírus ocorreram em ambas as faixas etárias, mas a população idosa necessitou de um acompanhamento médico mais intenso.

O primeiro relato de infecção do hMPV em pacientes imunocomprometidos ocorreu em 2002, quando Pelletier *et al* (2002) descreveram duas infecções consecutivas em uma criança imunocomprometida, por duas linhagens distintas do hMPV.

A partir deste estudo, seguiram-se outros trabalhos que procuraram obter mais informações acerca da relevância do hMPV neste importante grupo de pacientes.

Van den Hoogen *et al* (2004) estudaram a prevalência do hMPV em quatro diferentes grupos de pacientes: crianças de até cinco anos de idade, indivíduos de todas as idades com sintomas de doença respiratória, pacientes imunocomprometidos e idosos. Este estudo confirmou a prevalência superior do hMPV em crianças hospitalizadas, seguida pela prevalência em pacientes imunocomprometidos e idosos.

Sumino *et al* (2005) avaliaram a presença do hMPV em lavados bronco-alveolares de pacientes imunocomprometidos, grande parte submetida a transplante de pulmão. De 495 pacientes com sintomas de infecção do trato respiratório, seis foram positivos para o hMPV pela técnica de PCR em tempo real. Outro fato importante foi a verificação de agravamento do quadro clínico nas amostras com elevados títulos do vírus (Sumino *et al*, 2005).

Em estudo realizado com uma coorte de indivíduos submetidos a transplante de pulmão, Kumar *et al* (2005) pesquisaram, ao longo de dois anos, os principais patógenos responsáveis por infecções respiratórias. Tal estudo incluiu 50 pacientes com sintomas de infecção do trato respiratórios pós-transplante e 50 pacientes assintomáticos. Um dos pacientes submetidos a transplante de pulmão apresentou infecção respiratória causada pelo hMPV (Kumar *et al*, 2005).

Gerna *et al* (2006) verificaram uma elevada prevalência do hMPV em lavados bronco-alveolares de pacientes submetidos a transplante de pulmão, quando comparada a de outros vírus respiratórios. Utilizando técnicas moleculares e de culturas celulares, estes autores sugeriram que o hMPV pode ser um dos mais

importantes vírus responsáveis por infecções do trato respiratório em pacientes submetidos a transplantes pulmonares (Gerna *et al*, 2006).

À análise concomitante da presença do hMPV em amostras de lavado bronco-alveolar e a avaliação histológica de biópsias de pacientes submetidos a transplante de pulmão, Larcher *et al* (2005) constataram que a replicação do vírus foi estatisticamente associada à ocorrência de rejeição no período de coleta das amostras. Tais dados sugerem que as rejeições de transplante são mais frequentes em pacientes com amostras respiratórias positivas para o hMPV (Larcher *et al*, 2005).

O hMPV é responsável por doenças em pacientes imunocomprometidos que foram submetidos a transplante de medula óssea. Estudos anteriores já haviam mostrado que além do hMPV outros vírus, em especial o VSR, eram responsáveis por causar doenças respiratórias muitas vezes graves neste grupo de pacientes em períodos pós-transplante.

Martino *et al* (2005) desenvolveram um estudo prospectivo de quatro anos que pesquisou a importância das infecções causadas por vírus respiratórios em adultos submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas que sofreram complicações respiratórias. O hMPV foi detectado em 16 (9,0%) amostras respiratórias pós-transplante, sendo que dessas, 9 (56,0%) ocorreram em transplantes alogênicos e 7 (44,0%) em transplantes autólogos (Martino *et al*, 2005).

Englund *et al* (2006), em estudo que visava pesquisar a importância do hMPV em pacientes submetidos a transplante de medula óssea e células-tronco hematopoiéticas, constataram a presença de infecção pelo hMPV em 5 de 163 pacientes (3,0%). A técnica utilizada foi a PCR em tempo real em amostras de lavado bronco-alveolar. Os sintomas variavam desde febre e congestão nasal até hemorragia pulmonar, pneumonia e insuficiência respiratória. Dos 5 pacientes infectados com o

vírus, 4 foram a óbito, reforçando o elevado potencial de letalidade desse patógeno em pacientes submetidos a tais transplantes (Englund *et al*, 2006).

1.5. Aspectos clínicos relacionados à infecção pelo hMPV

Os aspectos clínicos desses pacientes mostraram-se muito semelhantes aos causados pelo VSR, incluindo-se desde sintomas respiratórios leves tais como tosse e coriza, até complicações mais graves tais como pneumonia e bronquiolite, geralmente acompanhados por febre, mialgia e vômitos (Van den Hoogen *et al*, 2001).

Bastien *et al*, em 2003, ao estudarem a prevalência da infecção pelo hMPV em amostras respiratórias provenientes de quatro laboratórios de saúde pública do Canadá. Observaram ocorrência do hMPV em pacientes de todas as faixas etárias, e verificaram que 33,0% das amostras positivas eram provenientes de pacientes hospitalizados.. Os principais sintomas clínicos apresentados pelos pacientes foram coriza (27,0%), pneumonia (27,0%), bronquiolite (23,0%) e bronquite (9,0%).

Em estudo retrospectivo que visava obter a prevalência e os sintomas clínicos associados à infecção pelo hMPV, Van den Hoogen *et al* (2004) constataram que os sintomas dos pacientes infectados por esse vírus eram muito semelhantes aos apresentados pelo VSR. Entre esses sintomas os mais freqüentes eram tosse (72,0%), coriza (80,0%), febre (61,0%), dispnéia (28,0%), chiado (24,0%), dificuldades na alimentação (36,0%), hiperventilação (42,0%) e taquicardia (23,0%) (Van den Hoogen *et al*, 2004).

Ebihara *et al* (2004), ao estudarem a soroprevalência do hMPV em crianças com infecção do trato respiratório, diagnosticaram casos de pacientes com bronquite, chiado, pneumonia entre outros sintomas. Os mesmos pesquisadores, com recurso a

técnicas sorológicas, comprovaram diversos episódios de reinfecção pelo vírus neste grupo de pacientes.

Greensil *et al* (2003), ao estudarem crianças com sintomas graves de bronquiolite, confirmaram a coinfecção do hMPV com o VSR em 70% dos indivíduos, sugerindo que esta poderia ser responsável pela gravidade dos sintomas apresentados. Além deste trabalho, outros investigadores comprovaram a coinfecção do hMPV com o vírus da influenza (Maggi *et al*, 2003; Boivin *et al*, 2003), vírus da SARS (Chan *et al*, 2003) e rinovírus (Bouscambert-Duchamp *et al*, 2005).

1.6. Diagnóstico da infecção por hMPV

O isolamento do vírus em culturas celulares foi proposto pela inoculação de amostras de lavado de nasofaringe em células terciárias de rim de macaco (tMK), rim de macaco verde africano (Vero), adenocarcinoma de intestino humano (A-549), células de rim de cachorro Madison Darby (MDCK) e fibroblasto de embrião de galinha (CEF). O efeito citopático, somente verificado nas células tMK, apresenta desenvolvimento lento, sendo semelhante ao causado pelo VSR, sem no entanto apresentar a formação típica de sincícios (Van den Hoogen *et al*, 2001).

Pelletier *et al* (2002) e Boivin *et al* (2002) propuseram, respectivamente, o isolamento do hMPV em células HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) e NCI (mucoepidermóide de pulmão humano). Ambas as linhagens não se mostraram permissivas ao vírus, concluindo-se que sua utilização para o isolamento do hMPV não deve ser considerada.

Uma importante contribuição para o estudo do isolamento do hMPV foi dada por Chan *et al* em 2003. Estes pesquisadores concluíram que as linhagens celulares de carcinoma de laringe humano (HEP-2) e rim de macaco *Rhesus* (LLC-MK2)

apresentaram os melhores resultados para o isolamento do hMPV. A linhagem celular HEP-2 foi a mais sensível para a detecção, verificando-se aparecimento de efeito citopático em 22 de 25 amostras confirmadamente positivas para hMPV. A principal vantagem da utilização destas linhagens se deve a sua ampla disponibilidade e sua fácil manutenção em laboratório (Chan *et al*, 2003).

Biacchesi *et al* (2004), em trabalho que incluiu o estudo da cinética de replicação e a otimização de crescimento *in vitro* do hMPV em duas linhagens celulares, recorreram à utilização da tripsina de modo a aumentar o efeito citopático do vírus. Além disso, obtiveram títulos mais elevados do hMPV em células LLC-MK2 do que em células Vero (Biacchesi *et al*, 2004).

Deffrasnes *et al* (2005) confirmaram os achados anteriormente citados. Utilizando a técnica de PCR em tempo real, estes autores também concluíram que o hMPV possui taxas de replicação mais elevadas em LLC-MK2 quando comparadas a outras linhagens celulares, entre elas Hep-2 e Vero.

É importante salientar o fato de que certas linhagens celulares, entre as quais a Hep-2 e a NCI, podem apresentar permissividade para mais de um vírus, influenciando o resultado do isolamento. Neste contexto, a técnica de imunofluorescência direta (IFD), normalmente utilizada na rotina de diagnóstico de vírus respiratórios (influenza A e B, parainfluenza 1-4, VSR e adenovirus), torna-se fundamental para avaliar se um isolamento para hMPV não poderá estar associado ao efeito citopático de outros vírus respiratórios, principalmente quando o estudo emprega uma grande variedade de linhagens celulares (Peret *et al*, 2002). Além da imunofluorescência, as reações em cadeia por polimerase (PCR) para coronavírus, rinovírus e outros vírus também têm sido utilizadas com o mesmo propósito (Van den

Hoogen *et al*, 2001; Jartti *et al*, 2002; Peret *et al*, 2002; Falsey *et al*, 2003; Rawlinson *et al*, 2003).

Além do isolamento viral, diversas outras técnicas têm sido propostas para diagnóstico da infecção pelo hMPV, entre elas, o ensaio imunoenzimático e as técnicas moleculares.

Falsey *et al* (2003), em estudo que incluiu a técnica sorológica de imunoenensaio enzimático, pesquisaram a soroconversão de anticorpos anti-hMPV da classe IgG em pacientes durante a época de inverno em dois anos consecutivos. Dos 984 pacientes sintomáticos admitidos no estudo, 42 (4,3 %) apresentaram um aumento de quatro vezes dos títulos de IgG entre a primeira e a segunda amostra de sangue. Em 217 pacientes assintomáticos admitidos, o número de amostras com soroconversão foi de 9 (4,1 %). Em ambos os anos, o mês de fevereiro, correspondente ao pico do inverno, foi o que apresentou o maior número de casos positivos para o hMPV (Falsey *et al*, 2003).

Desde os trabalhos iniciais de caracterização do genoma do hMPV, a técnica de PCR e suas variantes passaram a ser as mais utilizadas para o diagnóstico do hMPV. Existe atualmente, entre a maioria dos pesquisadores, um consenso de que as técnicas moleculares apresentam os melhores resultados para o diagnóstico do hMPV quando comparadas à outras técnicas (McIntosh *et al*, 2004).

A técnica de “*nested*” PCR têm sido aplicada para o diagnóstico do hMPV. Esta técnica, que tem como princípio à utilização um par de *primers* externos em uma primeira fase da reação seguida de uma segunda amplificação com um novo par de *primers* internos, apresenta maior sensibilidade quando comparada ao PCR convencional, mas, em contrapartida, pode ser muito suscetível a contaminações (Takao *et al*, 2003).

Devido a sua elevada sensibilidade e possibilidade de quantificação da carga viral em amostras clínicas, a técnica de PCR em tempo real tem sido amplamente utilizada em diversos trabalhos que visam o estudo de vírus respiratórios e outros patógenos.

Maertzdorf *et al* (2004) desenvolveram uma PCR em tempo real capaz de detectar as diferentes linhagens genéticas do hMPV. Os *primers* e sondas foram desenhados a partir da região conservada do nucleocapsídeo, e as amostras sabidamente positivas das linhagens do vírus foram cultivadas em células tMK (células terciárias de macaco), extraídas e submetidas a PCR em tempo real. A técnica detectou, com elevadas sensibilidade e especificidade, as quatro diferentes sub-linhagens do hMPV (Maertzdorf *et al*, 2004).

Von Linstow *et al* (2004), com recurso a técnica de PCR em tempo real, compararam a prevalência da infecção do HMPV com o VSR em crianças com infecção respiratória aguda, durante duas épocas de inverno consecutivas. O hMPV foi detectado em 2,9% dos pacientes contra 49,6% infectados pelo VSR. Os pesquisadores detectaram ainda duas coinfeções, mas não verificaram agravamento dos sintomas (Von Linstow *et al*, 2004).

Em estudo realizado com material biológico de crianças hospitalizadas por bronquiolite na França, Bouscambert-Duchamp *et al* (2005) desenvolveram uma PCR em tempo real que detectou a presença do hMPV em aspirados de nasofaringe de 6,4% destes pacientes. O hMPV foi apontado como o terceiro agente etiológico em frequência responsável por causar bronquiolites graves neste grupo de pacientes, apenas atrás do VSR e rinovírus (Bouscambert-Duchamp *et al*, 2005).

Boivin *et al* (2003) estudaram a presença do hMPV e outros vírus respiratórios em amostras biológicas de crianças com sintomas de infecção

respiratória recorrendo a técnica de PCR em tempo real em formato *multiplex*. De 208 aspirados de nasofaringe coletados em período de inverno, 5,8% foram positivos para o hMPV, 21,% positivos para influenza A e 51,0% positivos para VSR (Boivin *et al*, 2003).

Scheltinga *et al* (2005) desenvolveram uma técnica de PCR em tempo real em formato *multiplex*, capaz de detectar a presença de dois vírus, o hMPV e o rinovírus, ambos responsáveis por causar importantes infecções do trato respiratório. Os resultados indicaram prevalências de 6,0% e 17,1% para hMPV e rinovírus, respectivamente, num total de 239 amostras analisadas (Scheltinga *et al*, 2005).

Apesar da técnica de PCR em tempo real em formato *multiplex* possibilitar a pesquisa de diversos patógenos em simultâneo e minimizar o tempo de duração das reações, Bellau-Pujol *et al* (2005) advertem que a presença de diversos pares de *primers* pode diminuir consideravelmente a sensibilidade da reação e favorecer o aparecimento de “dímeros de *primers*”.

Em semelhança ao verificado para o VSR e o APV, vírus filogeneticamente mais próximos ao HMPV, a proteína de fusão é altamente conservada e eficaz para o diagnóstico dos dois sub-grupos do vírus (Van de Hoogen *et al*, 2004). Conclusões semelhantes às anteriores foram relatadas por Kuypers *et al*, que também justificaram a utilização da região da fusão em técnicas moleculares de detecção do hMPV (Kuypers *et al*, 2005).

1.7. Padronização de técnicas de Biologia Molecular para detecção do hMPV

A partir da PCR, descrita por Van den Hoogen *et al* (2001), vários trabalhos envolvendo técnicas moleculares foram sendo publicados, não havendo, porém, até o momento, técnicas comercialmente disponíveis. Não existe também uma técnica

molecular que possa ser considerada como o “padrão ouro” e diferentes grupos de pesquisa ainda procuram a técnica ideal para detecção do hMPV em secreções respiratórias.

A padronização de uma técnica de biologia molecular “in-house” permite aos pesquisadores adaptarem várias reações aos recursos disponíveis em cada laboratório bem como a determinadas condições da rotina laboratorial.

De modo a garantir que as técnicas de PCR alcancem elevados níveis de sensibilidade e especificidade, o biólogo molecular deve padronizar seu protocolo de modo a evitar problemas de execução tais como: aparecimento de produtos inespecíficos, ausência de bandas na visualização do gel, contaminações e impureza das amostras (Vieira *et al*, 2002).

A importância dos reagentes e das condições da reação de PCR tem sido tema constante de discussão entre os pesquisadores (Ausubel *et al*, 1994). As principais condições que influenciam o desempenho de uma reação de PCR são o desenho e concentração dos *primers*, as concentrações dos diferentes reagentes, em especial o tampão, desoxinucleotídeos e o cloreto de magnésio, o número de ciclos, as temperaturas de denaturação e anelamento e a adição de co-solventes (Hehegariu *et al*, 1997).

Antes do início da execução do protocolo de PCR, deve-se planejar cuidadosamente o método de extração de ácidos nucleicos a ser desenvolvida bem como ao desenho das seqüências e a composição dos *primers*.

Além da complementaridade com a seqüência alvo, os *primers sense* e *antisense* devem possuir os respectivos pontos de fusão médios (T_m) próximos, de modo a facilitar o anelamento e possibilitar a continuidade dos ciclos. A seqüência de bases dos *primers* também deve ser desenvolvida de modo a evitar à formação de

dímeros de *primers*, ou seja, de complementaridade entre os *primers*, que podem diminuir a capacidade de detecção da técnica de PCR e aumentar os riscos de aparecimento de resultados falsos negativos.

A enzima *DNA polimerase* deve sempre ser termoestável e operar em condições de reação instituídas e mantidas pelos tampões específicos, além de ser ativada pela presença de um íon metálico específico.

Os reagentes cloreto de magnésio e deoxinucleotídeos podem também influenciar drasticamente o funcionamento de uma reação de PCR.

O cloreto de magnésio funciona como cofator da enzima *DNA polimerase* podendo afetar as temperaturas de denaturação das fitas de DNA e o anelamento dos *primers*. Além disso, altas concentrações desse reagente podem ser responsáveis pelo aparecimento de produtos inespecíficos formados pelo aumento excessivo da atividade enzimática e pela formação de dímeros de *primers*. Os deoxinucleotídeos são fundamentais para a construção das novas cadeias a cada ciclo da PCR e devem estar presentes em iguais concentrações. Elevadas concentrações desse reagente podem afetar a especificidade dos *primers*.

Os co-solventes podem ser empregados em reações de PCR em que a região alvo a ser amplificada é rica em bases guanina (G) e citosina (C). Isso está ligado ao fato de que em tais seqüências torna-se mais difícil a denaturação das fitas, devido à força das três ligações de pontes de hidrogênio entre as duas bases. Diversos trabalhos comprovaram o aumento da especificidade na técnica de PCR causada pela adição de co-solventes, entre os quais o glicerol (Navaneetham et al, 1998; Paragas et al, 1998; Cândido *et al*, 2000) o dimetilsufóxido (Paragas et al, 1998; Whinship, 1989; Bachmann *et al*, 1990; Cândido *et al*, 2000; Chakrabarti *et al*, 2001) e a formamida (Sarkar *et al*, 1990; Paragas et al, 1998).

Até a publicação do trabalho de Coté *et al* (2003), nenhuma avaliação sistemática das técnicas moleculares para a detecção do hMPV em amostras clínicas havia sido realizadas. Estes pesquisadores, por comparação dos resultados obtidos pela técnica de RT-PCR em tempo real para os diferentes genes do vírus, concluíram que as técnicas que utilizam *primers* desenvolvidos para amplificar as regiões N (nucleocapsídeo) e L (polimerase) são as que apresentam, respectivamente, melhores resultados para a detecção do hMPV. Além disso, também confirmaram a maior sensibilidade da PCR em tempo real em relação outras técnicas (Coté *et al*, 2003; Boivin *et al*, 2003).

Até a presente data, não existem trabalhos publicados em nosso meio que comparem o desempenho de duas técnicas de biologia molecular para diagnóstico do metapneumovírus humano em secreções respiratórias.

1.8. Infecção por hMPV no Brasil

Até a presente data, apenas Cuevas *et al* (2003) detectaram a presença do hMPV em pacientes no Brasil. De 111 crianças com sintomas de infecções respiratórias atendidas em hospitais de Aracajú, 17,0% apresentaram resultado positivo para o vírus, evidenciando a ocorrência deste patógeno no país (Cuevas *et al*, 2003).

A escassez de dados sobre este importante patógeno no Brasil justifica a execução de estudos que avaliem as principais metodologias moleculares de detecção do vírus, com ênfase em estudos que incluam grupos sob alto risco de aquisição de doença grave provocada pelo mesmo.

O presente estudo foi proposto considerando-se que:

Estudos recentes demonstram que o hMPV é um dos mais importantes patógenos encontrados em pacientes com sintomas respiratórios, podendo o quadro clínico de tais pacientes evoluir para complicações pulmonares e, em alguns casos, óbito. Neste contexto, técnicas laboratoriais com elevada sensibilidade e especificidade devem ser desenvolvidas para detectar o vírus em amostras respiratórias.

Não existe em nosso meio, até a presente data, estudo de padronização de técnica de PCR e de comparação entre as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real para a detecção de hMPV em amostras clínicas de secreção respiratória.

As técnicas moleculares, especialmente a reação em cadeia por polimerase, tem sido a mais utilizada para a detecção do hMPV em secreções respiratórias. Na ausência de técnicas comercialmente disponíveis, é essencial que as técnicas moleculares “in-house” sejam bem padronizadas, de modo a garantir sua reprodutibilidade em diferentes grupos de pesquisa.

Objetivos:

- Padronizar duas reações em cadeia por polimerase (PCR) - PCR convencional e PCR em tempo real - para a detecção do RNA do hMPV em secreções respiratórias.

- Avaliar a concordância existente entre as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real em amostras clínicas de lavado de nasofaringe de pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas com sintomas de infecção respiratória.

4.1. Amostras de secreção respiratória

As amostras de secreção respiratória foram colhidas e estocadas a -80°C , durante a execução de projeto anteriormente realizado no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical (LIM 52 – HCFMUSP), a saber:

- ✓ “Infecção pelo vírus sincicial respiratório em receptores de transplante de medula óssea e em crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência adquirida”.

As amostras de secreção respiratória selecionadas para este estudo eram de lavado de nasofaringe (LNF) obtidas de pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e que apresentavam sintomas de infecção respiratória no acompanhamento ambulatorial pós-transplante entre o período de abril de 2001 a dezembro de 2003.

Foram utilizadas 249 amostras de lavado de nasofaringe colhidas nos primeiros sete dias do início do quadro clínico obtidas de pacientes pertencentes à base de dados do referido projeto.

Foi preservado, rigorosamente, o anonimato dos indivíduos originalmente envolvidos nos projetos, que ensejaram a obtenção do material a ser utilizado na presente pesquisa. O estudo contou com a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq - da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo nº 521/04 – ANEXO I).

4.2. Padronização de técnicas de PCR para detecção do hMPV

Os métodos laboratoriais realizados no decorrer desta etapa do projeto respeitaram uma seqüência de eventos representados no seguinte fluxograma:

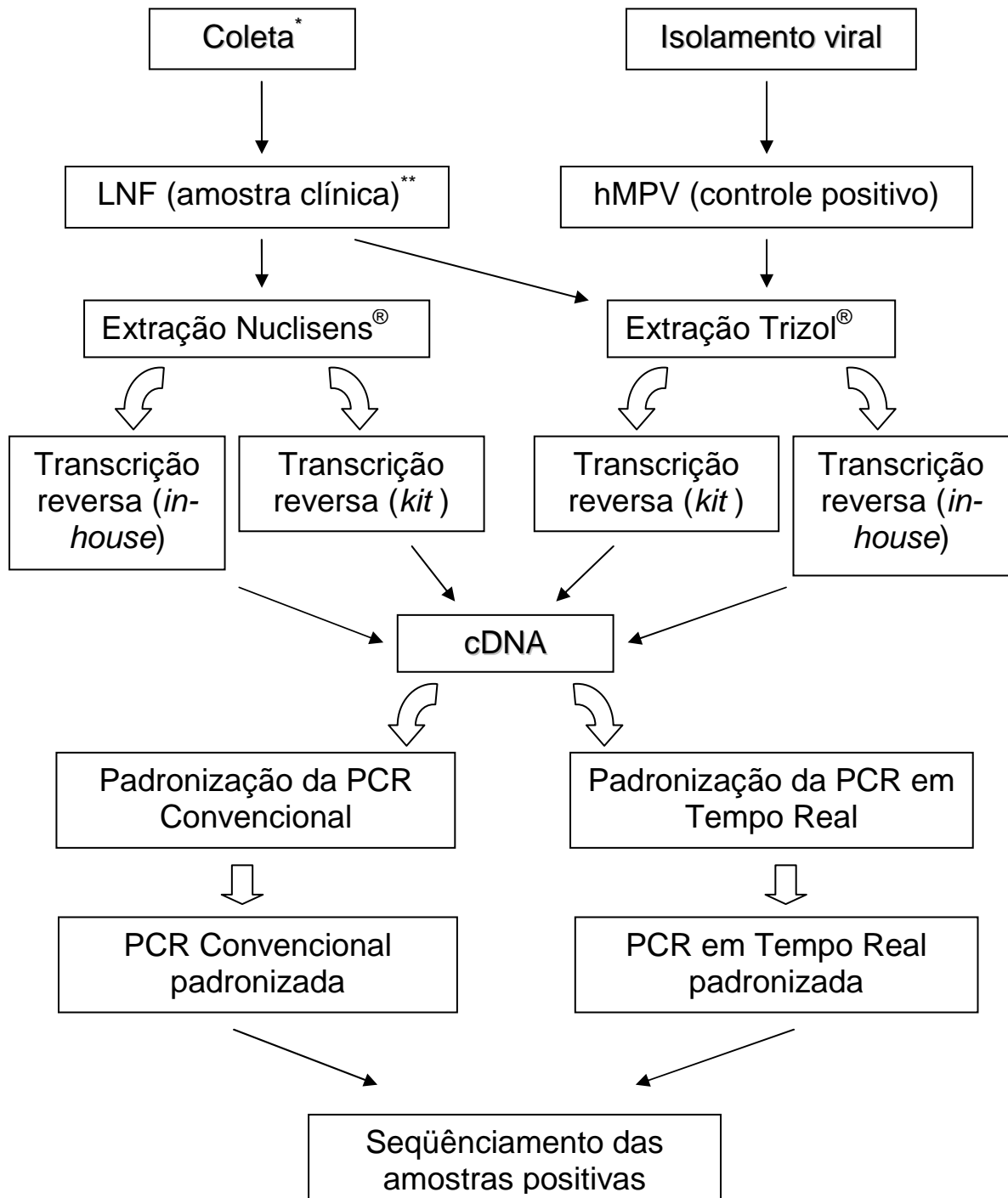


Figura 3: Fluxograma das técnicas laboratoriais envolvidas no estudo. LNF – lavado de nasofaringe (amostra clínica); hMPV – vírus obtido por isolamento viral (controle positivo); cDNA – DNA complementar; PCR – reação em cadeia por polimerase. Não está presente no fluxograma a etapa de obtenção de controles positivos por clonagem (4.2.4.). *Etapa realizada em projeto anterior. **As amostras de LNF foram processadas pelas técnicas do Trizol[®] ou Nuclisens[®] conforme estocagem previamente realizada.

4.2.1. Isolamento viral - obtenção de amostras de controle de hMPV

Controles positivos do vírus foram cultivados através de cultura de células LLC-MK2 infectadas com a cepa ARG-3-02 do hMPV gentilmente cedida pela Dra. Vivian Luchsinger do Instituto de Ciências Biomédicas da Faculdade de Medicina da Universidade do Chile, empregando protocolos de isolamento viral fornecidos pela mesma (Apêndice I). O isolamento viral está descrito detalhadamente a seguir.

Prepararam-se os meios de crescimento de células, inoculação de hMPV e de manutenção de cultivo de hMPV conforme os protocolos fornecidos pelo autor.

Inocularam-se as garrafas contendo cultura de células LLC-MK2 com 100,0µl da amostra de hMPV. Adicionou-se em seguida 40,0 mL de meio de inoculação (Cultilab, Brasil), de modo a facilitar a penetração das partículas virais nas células. Após 24 horas, procedeu-se à troca do meio de inoculação por 40,0 mL de meio de manutenção de cultivo de hMPV. Durante 10 dias consecutivos observou-se em microscópio óptico o aparecimento de efeito citopático. Na presença de tal efeito, uma extração de RNA do isolado seguida por transcrição reversa foi realizada de modo a obter-se elevadas quantidades de controle positivo de hMPV.

O aparecimento de efeito citopático do hMPV em células LLC-MK2 foi dependente da adição de adjuvantes, entre os quais a tripsina e o HEPES (*Difco*, Michigan, EUA).

O efeito citopático ocorreu, em média, a partir do sétimo dia pós-inoculação, e caracterizou-se pela ausência de formação típica de sincícios e lenta destruição do “tapete” de células.

Todo o procedimento foi levado a cabo em condições rigorosas de assepsia em capela de fluxo laminar.

4.2.2. Extração de RNA total das amostras

O tipo de extração de RNA realizado nas amostras de lavado de nasofaringe ao longo do estudo foi determinado conforme o tipo de estocagem que tais amostras sofreram no projeto previamente citado. Deste modo, tais amostras foram processadas pelas técnicas de extração do Trizol[®] (Invitrogen, CA, EUA) ou Nuclisens[®] (Biolab-Mérieux). Os controles positivos obtidos por isolamento viral (4.2.1.) foram processados exclusivamente pela técnica de extração do Trizol[®].

4.2.2.1. Extração pelo método do Trizol[®]

Adicionaram-se 200,0 µl de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) aos tubos contendo 250,0 µl da amostra clínica e 750,0 µl do Trizol[®] (Invitrogen, CA, EUA).

Os tubos foram homogeneizados vigorosamente durante 15 segundos, incubando-se em seguida em gelo por 5 minutos e centrifugando-se a 17000 g durante 15 minutos a 4°C, até ter-se verificado a separação em duas fases.

Em seguida, foram aliquotados 400,0 µl de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) gelado em tubos novos. Transferiu-se o sobrenadante contendo RNA, dos tubos que saíram da centrífuga, para os tubos contendo isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e realizou-se nova homogeneização. Incubou-se por 15 minutos

a 4°C, e em seguida, centrifugou-se novamente, a 17 000 g por 15 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, lavou-se o *pellet* contendo o RNA com 800 µl de etanol 75% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após nova homogeneização, centrifugou-se a 8000 rpm por 8 minutos a 4°C.

Preparou-se o solvente, constituído por 50,0µl de água e 0,5µl de inibidor de RNAses (*RNAse-Out* 40U/µl - Invitrogen, CA, EUA) por amostra. Secou-se bem o *pellet*, descartando-se todo o sobrenadante. Por fim, o *pellet* foi ressuspensão com 50,0µl do solvente.

4.2.2.2. Extração pelo método da sílica-gel

Adicionaram-se 50,0 µl de sílica (Nuclisens® Biolab-Mérieux) nos tubos contendo 400,0 µl de amostra e 600,0 µl de tampão de lise 5 mol/l (Nuclisens® Biolab-Mérieux), submetendo-os a homogeneização. Mantiveram-se os tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos, fazendo-se nova homogeneização a cada 2 minutos, o que permitiu a ligação do RNA à sílica por aderência. Centrifugou-se durante 20 minutos a 7800 g. Aspirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 1,0 mL de tampão de lavagem (Nuclisens® Biolab-Mérieux). Homogeneizou-se vigorosamente até que se dissolvesse o *pellet* formado. Realizou-se uma nova centrifugação durante 20 minutos a 7800 g, desprezando-se o sobrenadante. Esse passo foi repetido por mais duas vezes.

Em seguida, lavou-se o *pellet* por duas vezes com etanol a 70% (Merck, Darmstadt, Alemanha), realizando-se nova centrifugação durante 20 minutos a 7800 g. Foram repetidas as lavagens, utilizando-se acetona pura (Merck, Darmstadt, Alemanha). Centrifugou-se em seguida durante 30 minutos a 17000 g. Secou-se o

pellet durante 10 minutos a 56° C, adicionando-se em seguida 50,0 µl de tampão de eluição (Nuclisens® Biolab-Mérieux).

Homogeneizou-se vigorosamente o tubo, recolocando-se a 56° C por mais 10 minutos. Centrifugou-se durante 1 minuto a 17000 g.

4.2.3. Transcrição reversa

Para a pesquisa de RNA do hMPV, previamente à PCR, procedeu-se à etapa de síntese do DNA complementar - cDNA. Para tal foram utilizados dois protocolos conforme a disponibilidade dos reagentes utilizados. Um protocolo utilizou a técnica “*in-house*” com *random primers* e a enzima transcriptase reversa de M-MLV (Applied Biosystems Inc. EUA) e outro utilizou o *kit* High–Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems Inc. EUA).

4.2.3.1. Transcrição reversa por técnica “*in-house*”

Na primeira fase da reação de síntese de cDNA, procedeu-se a uma linearização do RNA, ajustando-se, no termociclador *Eppendorf Gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), a temperatura para 65° C durante 5 minutos, e utilizando-se o *mix* I, constituído pelo tampão, os nucleotídeos (dNTPs), o cloreto de magnésio (MgCl₂), o inibidor de RNases (*RNAse-Out* 40U/µl - Invitrogen, CA, EUA), o DTT (Invitrogen, CA, EUA) e o RNA extraído, nas concentrações e volumes mostrados na tabela 1.

Posteriormente, e numa segunda fase da reação, o termociclador *Eppendorf Gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) foi ajustado para 22° C durante 10 minutos, e fora acrescentado ao *mix* I, 5,5 µl do *mix* II, constituído pela enzima M-

MLV, a água livre de RNAses e os *primers* randômicos - PDN (Invitrogen, CA, EUA), nas concentrações indicadas na tabela 2.

Tabela 1: Reagentes e respectivos volumes e concentrações utilizados na primeira fase da reação de transcrição reversa – *mix I*.

Reagente	Volume (μ l)	[] final
Tampão (10 X)	4,0	1,0 X
DNTPs (2,5 mM)	3,2	0,2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	4,0	5,0 mM
DTT (0,1 M)	0,2	10 ⁻³ M
RNAse-Out	1,0	1,0 U
Volume final	12,6	
Volume RNA	22,0	

Tabela 2: Reagentes e respectivos volumes e concentrações utilizados na segunda fase da reação de transcrição reversa – *mix II*.

Reagente	Volume (μ l)	[] final
PDN (10 μ M)	2,0	0,5 μ M
M-MLV (200 U/ μ l)	0,5	2,5 U/ μ l
Água	3,0	-
Volume final	5,5	

Finalmente, para a síntese do cDNA, seguiu-se um programa de 30 minutos a 37° C e por último, para inativação da enzima, a temperatura foi elevada para 95° C durante 5 minutos.

4.2.3.2. Transcrição reversa com *kit*

Neste caso a síntese de cDNA foi realizada com recurso ao *kit High–Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems, EUA). Para tal adicionaram-se a cada tubo contendo 50,0 µl de RNA da amostra os seguintes reagentes: 10,0 µl de tampão (10X), 10,0µl de *primers* randômicos (10X), 4,0µl de dNTPs (25X), 5,0µl de enzima *Multiscribe* (50 U/µl) e 21,0µl de água livre de RNAses.

Em seguida, os tubos foram sujeitos a um ciclo no termociclador *Eppendorf Gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) de 10 minutos a 25°C e 120 minutos a 37°C.

4.2.4. Clonagem em bactérias recombinantes

Um dos passos fundamentais para a padronização das técnicas moleculares é a obtenção dos controles positivos puros, que são extremamente úteis para se estimar, com rigor, os limites de detecção das reações de PCR convencional e PCR em tempo real.

De modo a aumentar a disponibilidade de controle, fragmentos específicos das regiões de fusão - F (PCR convencional) e da região do nucleocapsídeo – N (PCR em tempo real) do hMPV, oriundos de isolados obtidos em culturas celulares, foram clonados em bactérias recombinantes, como se explica a seguir.

Processaram-se as amostras purificadas conforme as técnicas de extração em Trizol[®], transcrição reversa com *kit* e PCR convencional, descritas respectivamente em 4.2.2.1., 4.2.3.2. e 5.1.1.12..

Seguiu-se, após a eletroforese em gel de agarose, o procedimento de purificação dos fragmentos de bases amplificados. Para tal, retirou-se do gel e purificaram-se os fragmentos através do *kit GeneClean* (Bio 101 Inc., EUA).

A ligação dos produtos da PCR foi realizada no vetor pGEM-T (Promega[®], EUA), específico para esse tipo de material. No processo de amplificação, polimerases termoestáveis adicionam deoxiadenosinas nas extremidades 3' do produto amplificado. Por essa razão, o vetor pGEM-T foi construído com a adição de timidina em suas extremidades 3', promovendo o aumento da eficiência de ligação de produtos de PCR a esse vetor.

A ligação do DNA plasmidial com o fragmento purificado foi desenvolvida na proporção de 1:2, acrescentando-se a enzima T4 DNA ligase, segundo as especificações do *kit* de ligação (Promega[®], EUA). Analisou-se o produto obtido na ligação por corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%.

Em seguida, os produtos da ligação - fragmentos do cDNA do hMPV incorporados ao vetor pGEM-T - foram submetidos ao processo de transfecção em bactérias *Escherichia coli* DH5- α . O produto de ligação (100 ng) e as bactérias *Escherichia coli* DH5- α foram incubados em gelo por 1 hora. Foram adicionados à colônia 500,0 μ l de meio de cultura Luria-Bertani (Gibco, EUA) e manteve-se sob agitação por 1h, a 37°C. As bactérias transformadas foram semeadas em placa com meio de cultura LB sólido em ágar acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina, 0,4% de X-

gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosida) e 100 mM de IPTG (isopropil-b-D-tiogalactopiransideo), por 18h a 37°C.

O vetor pGEM-T contém um sitio de resistência a ampicilina que isola somente colônias de bactérias transformadas, além de possuir o gene da β -galactosidase (X-gal) que permite a diferenciação de colônias de bactérias que possuam o plasmídeo com ou sem o inserto. O gene da X-gal em presença de IPTG e X-gal expressa o galactosídeo que tem coloração azul, pigmentando a colônia em azul. A inserção do fragmento de DNA interrompe a seqüência do gene da X-gal, tornando-o inativo e conseqüentemente produzindo colônias brancas.

A extração e purificação do DNA recombinante das colônias de bactérias resistentes a ampicilina foi realizada através da adaptação da técnica de lise alcalina, segundo Birnboim e Doly (1979).

4.2.5. Padronização das reações em cadeia por polimerase (PCR)

A detecção do cDNA obtido das amostras de secreção respiratória foi realizada através de reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional e reação em cadeia de polimerase em tempo real, que foram alvo de padronização ao longo do estudo.

4.2.5.1. Padronização da PCR convencional

O estudo da padronização da técnica de PCR convencional para o hMPV iniciou-se com base em *primers* complementares à região conservada da proteína de fusão do vírus – região F – descritos por Falsey *et al* (2003) e selecionados a partir da

estirpe protótipo do hMPV 00-1 (número de acesso do *GeneBank*: af371337). A tabela 3 mostra as seqüências dos *primers*.

Tabela 3: Seqüências dos *primers* em relação à terminação 5' da estirpe protótipo do hMPV.

<i>Primer</i>	Gene	Seqüência (5' - 3')
F1	Fusão	GAGCAAATTGAAAATCCCAGACA
R1	Fusão	GAAAACTGCCGCACAACATTTAG

O protocolo inicial de PCR convencional utilizada como “molde” para o desenvolvimento da padronização era constituído por uma reação de volume final de 25,0 µl contendo 5,0 µl de cDNA; 2,5 µl de tampão 10 X; 2,0 µl de dNTPs 2,5 mM; 1,0 µl de MgCl₂ 50mM; 1,25 µl de cada *primer* (F1 e R1) 10,0 µM; 11,8 µl de água DEPC e 0,2 µl de enzima *Taq* DNA Polimerase 5,0 U/µl (Invitrogen, CA, EUA). Estes tubos foram submetidos à amplificação em termociclador *Eppendorf Gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) como se segue: 2,0 minutos a 95° C para denaturação do cDNA; 1,0 minuto a 94° C, 1,0 minuto a 55° C para anelamento dos *primers*, 1,0 minuto a 72° C para extensão da seqüência repetidos por 35 ciclos e ainda uma extensão final a 72° C durante 10 minutos. Para a revelação dos produtos de amplificação, retirou-se de cada tubo de reação 10,0 µl de amostra e aplicou-se em gel de agarose 1,5% (A 1000, Gibco, EUA), diluído em TAE (tris-acetato-EDTA, Gibco, EUA) contendo 0,8 mg/mL de brometo de etídeo (Invitrogen, CA, EUA) e que, em seguida, foi submetida a corrente de 80 V para a eletroforese.

A padronização da técnica de PCR convencional baseou-se em protocolo “*step-by-step*” descrito por Henegariu *et al* (1997), que inclui um roteiro de medidas a serem tomadas durante a elaboração de uma técnica de PCR.

As variáveis estudadas durante a padronização da reação de PCR convencional foram respectivamente: temperatura de anelamento dos *primers*, concentração do reagente cloreto de magnésio, quantidade de cDNA (*template*), transcrição reversa - *primers* específicos vs *primers* randômicos, concentração final dos *primers*, comparação com outro par de *primers*, número de ciclos, reagente DNA polimerase[®], termociclador e adição de cosolventes.

4.2.5.1.1. Temperatura de anelamento dos *primers*

De modo a verificar a temperatura ideal de anelamento dos *primers* F1 e R1, realizou-se, em termociclador *Eppendorf Gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), uma reação de “PCR em gradiente” contendo suspensão de células infectadas por hMPV obtidas em 4.2.1., onde se modificaram apenas as temperaturas de anelamento dos *primers* em intervalos regulares de 50,0° C a 65,0° C.

4.2.5.1.2. Concentração do reagente cloreto de magnésio (MgCl₂)

Sabe-se que a concentração e quantidade do reagente cloreto de magnésio (Invitrogen, CA, EUA), importante cofator da enzima DNA polimerase, são fatores críticos na padronização de uma reação de PCR.

De modo a obter a quantidade ideal desse reagente na reação, foram testadas suspensão de células infectadas por hMPV obtidas em 4.2.1. em que apenas se alterou a quantidade de cloreto de magnésio 50mM (Invitrogen, CA, EUA). As quantidades testadas foram de 0,75 µl; 1,0 µl; 1,5 µl e 2,0 µl.

4.2.5.1.3. Quantidade de cDNA (*template*)

O excesso de cDNA ou *template* a ser amplificado e a proporção volume total:volume de cDNA podem ser fatores que levam ao aparecimento de bandas inespecíficas ou “arrastes” na reação de PCR, prejudicando a visualização das bandas no gel.

A influência da quantidade de cDNA na reação de PCR foi testada alterando-se, respectivamente, o volume do cDNA de suspensão de células infectadas por hMPV obtidas em 4.2.1. em 10,0 µl; 7,5 µl; 5,0 µl e 2,5 µl.

4.2.5.1.4. Transcrição reversa por *primers* específicos vs *random primers*

A etapa de transcrição reversa, anterior a PCR, consiste em produzir segmentos de cDNA a partir de segmentos de RNA com *random primers*, que amplificam aleatoriamente todos os segmentos de RNA contidos na amostra, ou ainda, produzir segmentos de cDNA com *primers* específicos para o microorganismo a ser pesquisado, que amplificam segmentos de RNA daquele microorganismo. Este procedimento deve ser escolhido com precaução, pois a fato de aumentarmos muito a especificidade pode comprometer a sensibilidade da reação e vice-versa.

Comparou-se um painel de amostras clínicas (4.1.) que apresentaram ampliações inespecíficas em duas condições: processadas por transcrição reversa com *random primers*, conforme descrito em 4.2.3.1., e processadas por transcrição reversa com os *primers* específicos – substituindo-se no protocolo o *random primers* PDN pelos *primers* específicos para hMPV - F1 e R1 – descritos por Falsey *et al* (2003).

4.2.5.1.5. Concentração final dos primers

Para uma reação PCR ser eficaz na detecção de um patógeno, um dos passos mais importantes é a escolha e concentração dos *primers*. Para tal submeteram-se amostras “*spike*” – amostras clínicas sabidamente negativas + cDNA de suspensão de células infectadas por hMPV – em diferentes diluições, utilizando-se duas diferentes concentrações finais dos *primers* F1 e R1: 0,1 μ M e 0,5 μ M.

4.2.5.1.6. Comparação com outro par de primers

Nesta etapa da padronização comparou-se o comportamento de um painel de amostras clínicas submetidas a reações em que se utilizaram dois pares de *primers* distintos: F1 e R1 (Falsey *et al*, 2003) e N2 e N3 (Boivin *et al*, 2003). Este último originava em amostras positivas uma banda de 929 pares de bases correspondente a segmento da região do nucleocapsídeo (N) (Boivin *et al*, 2003).

4.2.5.1.7. Número de ciclos

O aumento do número de ciclos de uma PCR pode elevar consideravelmente a sensibilidade final da reação. Alguns autores defendem ainda o chamado “*plateau*” da reação – número máximo de ciclos a partir do qual o aumento do número de ciclos não influencia mais a sensibilidade da reação. Com algumas exceções, o “*plateau*” de uma reação de PCR encontra-se entre os 40 e 50 ciclos (Henegariu *et al*, 1997).

De modo a estimar o número ideal de ciclos, submeteram-se amostras de isolados do hMPV a reações de PCR em que se alteraram o número de ciclos em 35, 40 e 45.

4.2.5.1.8. Termociclador

A utilização de diferentes termocicladores pode levar a pequenas variações nos resultados da PCR, uma vez que os tempos de aquecimento e esfriamento da placa variam entre os diversos aparelhos disponíveis no mercado.

De modo a verificar se a utilização de outro termociclador alterava os resultados da PCR para hMPV, testaram-se amostras clínicas em dois aparelhos distintos: o termociclador *Eppendorf Gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e o termociclador PTC-200 Gradient Cycler (MJ Research, Inc., EUA).

4.2.5.1.9. Reagente DNA polimerase

A enzima DNA polimerase é responsável pela adição de nucleotídeos e consequente formação de novos segmentos nucleicos na reação de PCR. A *Platinum Taq DNA Polimerase*[®] (Invitrogen, CA, EUA) é uma enzima que aumenta a sensibilidade da reação e apresenta a vantagem de ser inativa a baixas temperaturas, evitando a formação de ligações inespecíficas.

Compararam-se as enzimas *Taq DNA polimerase*[®] e *Platinum Taq DNA polimerase*[®] (Invitrogen, CA, EUA) em dois protocolos em que apenas se modificou a enzima a ser utilizada.

4.2.5.1.10. Adição de co-solventes

Os co-solventes, tais como DMSO (dimetil-sufóxido) e o glicerol, são amplamente utilizados nas reações de PCR, pois funcionam como agentes denaturantes, facilitando a denaturação total das fitas do DNA principalmente em seqüências ricas em nucleotídeos G e C (Vieira, 2002).

O reagente vermelho de Cresol permite ainda a aplicação do produto de reação diretamente no gel de agarose sem a necessidade de manipulações pós-PCR e evita a adição de tampões corantes para visualização do produto durante a eletroforese (Navaneetham *et al*, 1998).

De modo a verificar se a adição de glicerol e vermelho de cresol influenciaria a qualidade da reação de PCR, testaram-se amostras clínicas na ausência e presença de tais co-solventes.

4.2.5.1.11. Estimativa do limite de detecção da reação

Para se calcular o limite de detecção da reação de PCR convencional foi necessário a obtenção de fragmentos puros de metapneumovírus humano, conforme descrito em 4.2.4..

A estimativa do limite de detecção requer cálculos matemáticos de modo a se inferir sobre a quantidade aproximada de “cópias” ou fragmentos do clone de hMPV que estavam presentes em determinada alíquota de material (ver Apêndice II) através da densidade ótica.

4.2.5.2. Padronização da PCR em tempo real

A padronização da técnica de PCR em tempo real baseou-se no protocolo “*Sequence Detection Systems – Chemistry Guide*” (Applied Biosystems, EUA) fornecido pelo fabricante, que inclui um roteiro de medidas a serem tomadas durante a elaboração de uma técnica de PCR em tempo real.

4.2.5.2.1. Desenho dos *primers*

O desenho dos *primers* baseou-se em seqüências oriundas da região conservada do nucleocapsídeo do vírus – região N – durante o estudo realizado no Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O objetivo principal foi o de desenvolver *primers* que detectassem o maior número possível de cepas do hMPV com elevada especificidade, em especial as cepas brasileiras.

Foram realizadas comparações genéticas de determinados segmentos da região do nucleocapsídeo (N) de diferentes cepas do hMPV, incluindo inclusive amostras positivas seqüenciadas durante este estudo, já que não existiam até a data da execução seqüências originárias do Brasil submetidas no *GeneBank*. Para tal, utilizou-se ferramentas de bioinformática BLAST e *SeqMan (Expert Analysis Software - DNASTar)*, que comparam diferentes seqüências nucleotídicas e suas respectivas similaridades.

Esta análise teve como principal objetivo selecionar os segmentos que apresentavam a menor quantidade de *mismatches* entre as seqüências das diferentes cepas, de modo a tornarem-se totalmente compatíveis as ligações entre *primers* e *template*.

4.2.5.2.2. Adequação das características dos *primers* ao sistema de detecção

Esta análise procurou restringir as características dos *primers* e sonda de acordo com as recomendações determinadas pelo sistema Taqman[®]/MGB[®] (Applied Biosystems, Inc., EUA), escolhido para a execução deste trabalho. As especificações

do fabricante, no que diz respeito ao tamanho, temperaturas de *melting* e composição de bases guanina/citosina de *primers*, sonda e *amplicon* estão sumarizadas a seguir:

Primers:

- Percentagem GC: entre 20 e 80%
- Temperatura de *melting* (TM): entre 58°C e 60°C
- Tamanho: entre 19 e 40 nucleotídeos (próximo de 20 nucleotídeos)

Sonda:

- 10°C acima da temperatura de *melting* dos *primers*

Amplicon:

- Tamanho: 50 a 150 nucleotídeos

4.2.5.2.3. Controle endógeno

O uso de um controle endógeno nas reações de biologia molecular constitui-se em etapa importante para detectar amostras com material genético degradado que levaria a resultados falso-negativos.

O *kit* utilizado foi o *Pre developed Taqman[®] Assay Reagents – Human HPRT (20X)* (Applied Biosystems, EUA). Este controle baseia-se na utilização de *primers* que amplificam segmento do gene da hipoxantina fosforribosiltransferase como um controle endógeno de RNA mensageiro (mRNA), já que o mesmo está sempre presente em amostras contendo material genético humano.

A cada amostra clínica testada para a presença do hMPV foi incluído mais um tubo contendo o *mix* do *kit* de HPRT e 5,0 µl da respectiva amostra seguindo-se as recomendações do fabricante.

4.2.5.2.4. Estimativa do limite de detecção da reação

Realizou-se a estimativa do limite de detecção da reação de PCR em tempo real de acordo com o descrito em 4.2.5.1.11..

4.2.6. Seqüenciamento das amostras positivas à detecção de RNA do hMPV

A etapa de seqüenciamento das amostras positivas do hMPV é essencial para testar a especificidade das reações durante a fase de padronização de uma reação de PCR.

A purificação das amostras clínicas positivas para o HMPV e seus respectivos produtos obtidos durante a execução das PCRs foi realizada pelo *KitMicrocon*[®] (Millipore Inc., EUA), conforme recomendações do fabricante.

Foi preparado um gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (1X) contendo 0,5µl/mL de brometo de etídeo (Invitrogen, CA, EUA). Depois da polimerização do gel foram aplicados 5,0µl do produto purificado, acrescidos de 5,0µl do carreador (*loading buffer*). Nas extremidades do gel foram aplicadas 6,0µl e 3,0µl do *Mass Ladder*, respectivamente.

Após a purificação e quantificação, as fitas de DNA foram seqüenciadas utilizando-se o kit *ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing ready Reaction kit (Big Dye - Applied Biosystems, Inc., EUA)* em seqüenciador automático ABI modelo 377 (Applied Biosystems, Inc. EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

As seqüências de nucleotídeos foram analisadas com o programa *SeqMan (Expert Analysis Software - DNASTar)* para PC (Applied Biosystems, Inc., EUA).

4.3. Comparação entre as técnicas de PCR

A comparação entre as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real foi realizada de acordo com o teste de concordância Kappa (Fleiss, 1981).

Para se descrever a intensidade da concordância entre dois ou mais testes, ou entre dois ou mais métodos, optou-se pela utilização da medida Kappa, que é baseada no número de respostas concordantes, ou seja, no número de casos cujo resultado é o mesmo entre os testes. O Kappa é uma medida de concordância interobservador e mede o grau de concordância além do que seria esperado tão somente pelo acaso. Esta medida de concordância tem como valor máximo o “1”, valor que representa o máximo de concordância e o “0”, que indica ausência de concordância. Um eventual valor de Kappa menor que zero, negativo, sugere que a concordância encontrada foi menor do que aquela esperada por acaso. Sugere, portanto, discordância, mas seu valor não tem interpretação como intensidade de discordância.

5. Resultados

5.1. Padronização de técnicas de PCR para detecção do hMPV

5.1.1. Padronização da PCR convencional

5.1.1.1. Temperatura de anelamento dos *primers*

A temperatura ideal obtida, correspondente à banda de 347 pares de bases mais nítida no gel de agarose 1,5%, foi de 55,0°C.

5.1.1.2. Concentração do reagente cloreto de magnésio (MgCl₂)

A quantidade ideal de cloreto de magnésio observada, correspondente à banda de 347 pares de bases mais nítida no gel de agarose 1,5%, foi de 0,75 µl.

5.1.1.3. Quantidade de cDNA (*template*)

A quantidade ideal de cDNA ou *template* observada, correspondente a banda de 347 pares de bases mais nítida no gel de agarose 1,5%, foi de 2,5 µl.

5.1.1.4. Transcrição reversa por *primers* específicos vs *random primers*

Observando-se a figura 4, apesar das bandas inespecíficas terem sido eliminadas quando utilizados os *primers* específicos, a sensibilidade da reação pareceu ser drasticamente reduzida, já que as bandas correspondentes aos controles positivos tornaram-se praticamente imperceptíveis quando comparadas a outras reações que envolveram o uso de *random primers*.

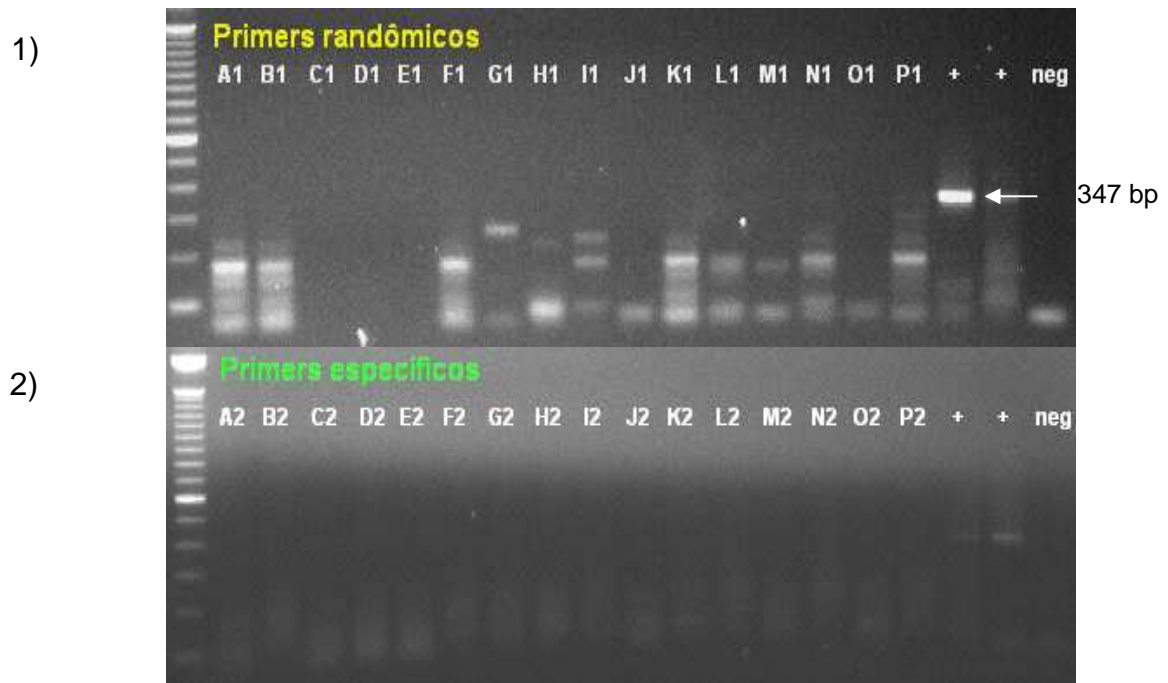


Figura 4: Fotografias de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (*Alphaimager*[®] EC, Alpha Innotech Corporation, EUA) referente a PCR de hMPV após corrida eletroforética de 80 V. 1) Amostras clínicas (A1-P1) submetidas a PCR com *primers* randômicos. 2) Amostras clínicas (A2-P2) submetidas a PCR com *primers* específicos; +: controle positivo; neg: controle negativo.

Por este fato, optou-se por manter o protocolo de transcrição reversa com *primers* randômicos.

5.1.1.5. Concentração final dos *primers*

Como mostra a figura 5, verificou-se que a concentração de primers de 0,1 μ M, além de ter reduzido o aparecimento de bandas inespecíficas, manteve a sensibilidade da reação mesmo em diluições muito baixas.

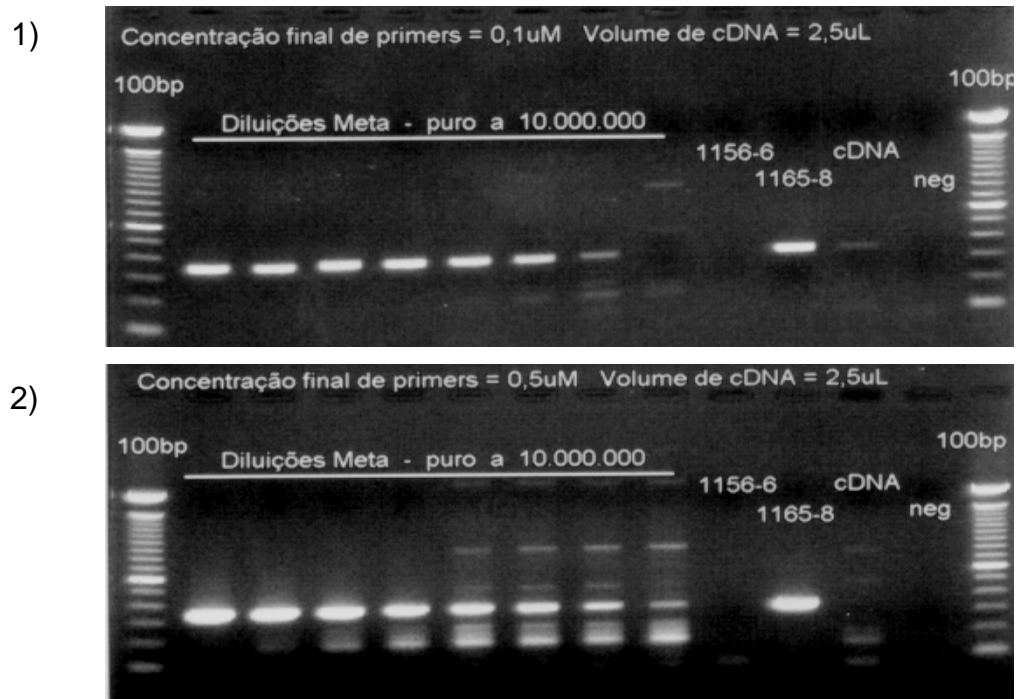


Figura 5: Fotografias de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (*Alphaimager*[®] EC, Alpha Innotech Corporation, EUA) referente a PCR de hMPV após corrida eletroforética de 80 V. 1) amostras “*spike*” de hMPV em diferentes diluições com concentrações de *primers* de 0,1 μ M e 2) com concentrações de *primers* de 0,5 μ M. 1156-6 e 1165-8: amostras clínicas; cDNA: amostra clínica utilizada para o “*spike*”; neg: controle negativo.

5.1.1.6. Comparação com outro par de *primers*

Os resultados da figura 6 demonstraram que em ambas as reações ocorreram o aparecimento de bandas inespecíficas e que os controles positivos e negativos funcionaram normalmente. No entanto, a partir desta reação, verificou-se que a inespecificidade da PCR não era exclusiva da utilização dos primers F1 e R1.

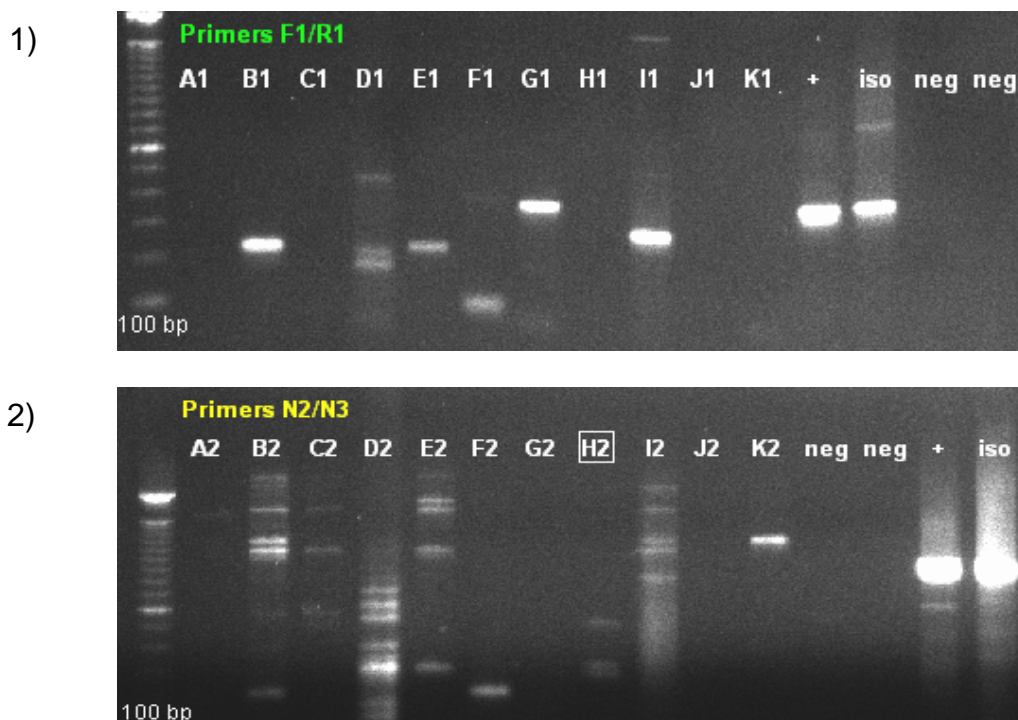


Figura 6: Fotografias de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (*Alphaimager[®] EC*, Alpha Innotech Corporation, EUA) referente a PCR de hMPV após corrida eletroforética de 80 V. 1) Amostras clínicas (A1-K1) submetidas a PCR com *primers* F1/R1 (Falsey *et al*, 2003); 2) amostras clínicas (A2-K2) submetidas a PCR com primers N2/N3 (Boivin *et al*, 2003); +: controle positivo; iso: controle positivo (isolamento); neg: controle negativo.

5.1.1.7. Número de ciclos

Ao comparar as diferentes bandas verificou-se que as bandas mais nítidas eram aquelas que foram sujeitas a uma reação composta por 40 ciclos.

5.1.1.8. Termociclador

Os resultados da figura 7 demonstraram que não ocorreram variações significativas quando utilizados diferentes termocicladores.

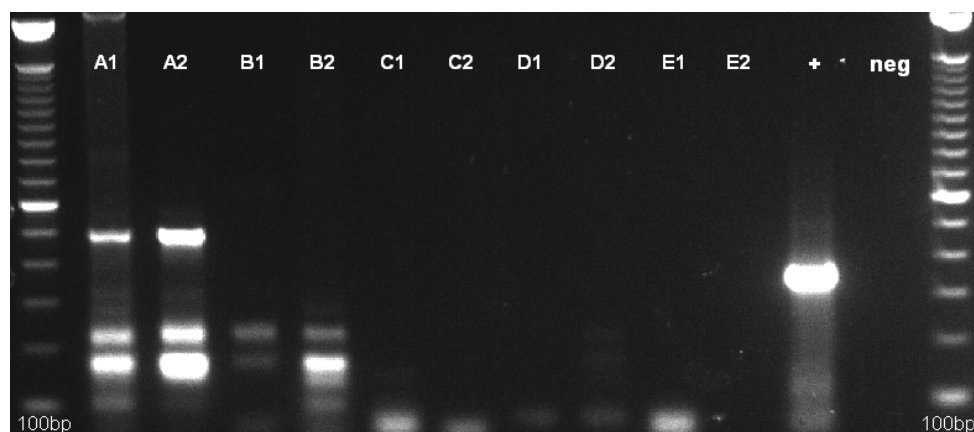


Figura 7: Fotografia de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (*Alphaimager*[®] EC, Alpha Innotech Corporation, EUA) referente a PCR de hMPV após corrida eletroforética de 80 V. A1-E1: amostras clínicas submetidas a PCR em termociclador *Eppendorf Gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha); A2-E2: amostras clínicas submetidas a PCR em termociclador PTC-200 Gradient Cyclor (MJ Research, Inc., EUA); +: controle positivo; neg: controle negativo.

5.1.1.9. Reagente DNA polimerase

A utilização da enzima *Platinum Taq DNA Polimerase*[®] (Invitrogen, CA, EUA) mostrou-se mais sensível do que a utilização da *Taq DNA Polimerase*[®] (Invitrogen, CA, EUA). Pelas vantagens apresentadas pela primeira, optou-se pelo uso desta nas posteriores reações de PCR.

5.1.1.10. Adição de co-solventes

A adição de Glicerol 57% e de Cresol 2,5 µg/µl (Invitrogen, CA, EUA) foram importantes para a padronização da reação de PCR para hMPV.

A figura 8 mostra duas reações de PCR onde é nítido o desaparecimento das bandas inespecíficas bem como a manutenção das bandas correspondentes às amostras controles positivas, mantendo desta forma a sensibilidade da reação.

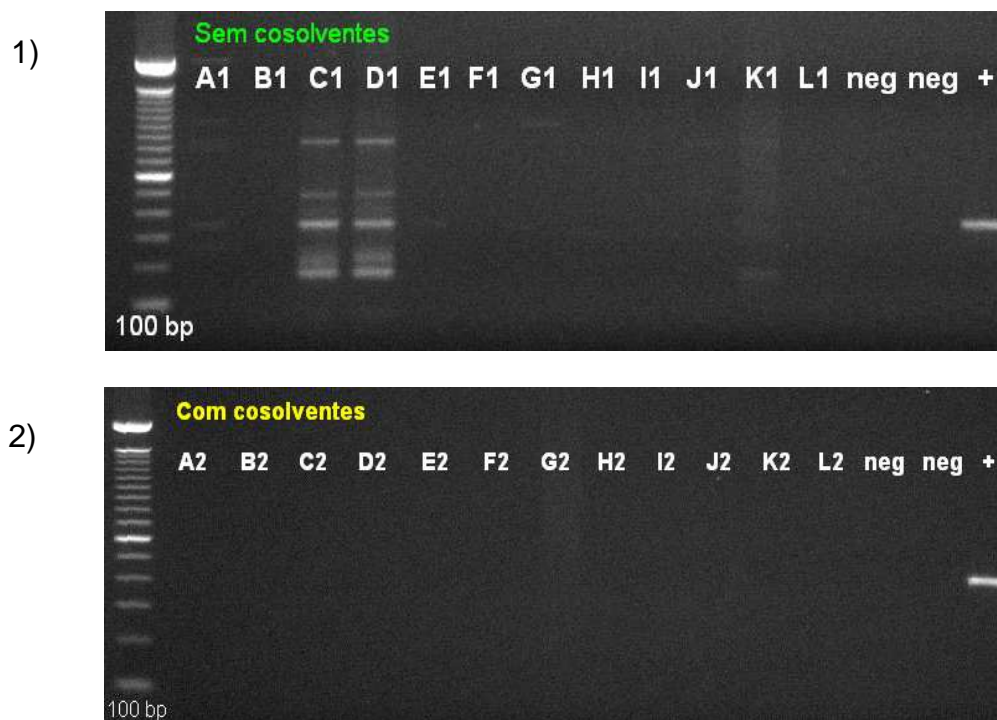


Figura 8: Fotografias de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (*Alphaimager*[®] EC, Alpha Innotech Corporation, EUA) referente a PCR de hMPV após corrida eletroforética de 80 V. 1) amostras clínicas (A1-L1) submetidas a PCR na ausência de cosolventes; 2) amostras clínicas (A2-L2) submetidas a PCR na presença de cosolventes; +: controle positivo; neg: controle negativo.

Esse passo da padronização foi de fundamental importância tendo sido realizado em todas as amostras clínicas que apresentavam bandas inespecíficas na visualização do gel.

5.1.1.11. Estimativa do limite de detecção da reação

A espectrometria da alíquota, a qual se chamou de “alíquota-mãe”, indicou uma densidade ótica de 118.900 µg/mL, que, pelos cálculos matemáticos efetuados, correspondem a aproximadamente 640×10^{10} cópias/mL (ver Apêndice II).

Uma vez estimado o número de cópias de clones/mL, diluições sucessivas da “alíquota-mãe” foram realizadas: tubo A – “alíquota-mãe” (640×10^{10} cópias/mL), tubo

B – diluição de $1:10^3$ (640×10^7 cópias/mL), tubo C – diluição de $1:10^6$ (640×10^4 cópias/mL), tubo D – diluição de $1:10^8$ (640×10^2 cópias/mL), tubo E – diluição de $1:10^9$ (6400 cópias/mL), tubo F – diluição de 1:2 (3200 cópias/mL), tubo G – diluição de 1:2 (1600 cópias/mL), tubo H – diluição de 1:2 (800 cópias/mL), tubo I – diluição de 1:2 (400 cópias/mL), tubo J – diluição de 1:2 (200 cópias/mL), tubo K – diluição de 1:2 (100 cópias/mL) e tubo L – diluição de 1:2 (50 cópias/mL). Realizaram-se em seguida PCR convencional padronizada (5.1.1.12.) com as respectivas diluições seriadas.

Como mostra a figura 9, a reação foi positiva em todas as diluições exceto no tubo L, correspondente a 50 cópias/mL. Dessa forma, o limite de detecção da PCR convencional foi estimado em aproximadamente 100 cópias/mL (tubo K).

Esta reação foi repetida três vezes para os tubos J, K e L. Em todas as reações os resultados se repetiram.

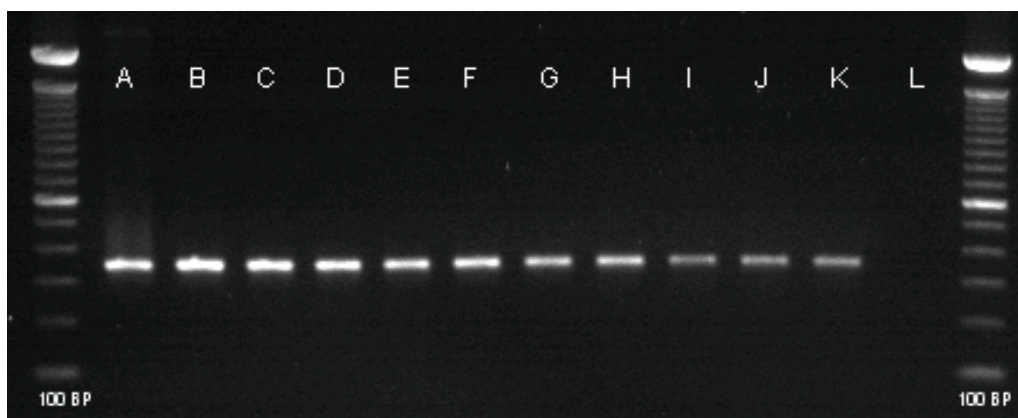


Figura 9: Fotografia de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (*Alphaimager*[®] EC, Alpha Innotech Corporation, EUA) referente à estimativa do limite de detecção da PCR convencional de hMPV após corrida eletroforética de 80 V. Cada letra corresponde à diluições do clone de hMPV. A – “alíquota-mãe” (640×10^{10} cópias/mL); tubo B (640×10^7 cópias/mL), tubo C (640×10^4 cópias/mL), tubo D (640×10^2 cópias/mL), tubo E (6400 cópias/mL), tubo F (3200 cópias/mL), tubo G (1600 cópias/mL), tubo H (800 cópias/mL), tubo I (400 cópias/mL), tubo J (200 cópias/mL), tubo K (100 cópias/mL) e tubo L (50 cópias/mL).

5.1.1.12. Reação de PCR convencional padronizada

O protocolo final da reação de PCR convencional padronizada incluiu um par de *primers* complementares à região conservada da proteína de fusão do vírus – região F – descritos por Falsey *et al* e selecionados a partir da estirpe protótipo do hMPV 00-1 (nº acesso do *GenBank*: af371337) (Falsey *et al*, 2003).

A seqüência alvo foi amplificada numa reação com volume final de 25,0 µl contendo 2,5 µl de cDNA; 2,5 µl de tampão 10 X; 2,0 µl de dNTPs 2,5 mM; 0,75 µl de MgCl₂ 50mM; 0,25 µl de cada *primer* (F1 e R1) 10,0 µM; 2,0 µl de solução de Glicerol 57%; 2,5 µl de Cresol Red 2,5 µg/µl; 12,05 µl de água DEPC e 0,2 µl de *Platinum Taq* DNA Polimerase 5,0 U/µl (Invitrogen, CA, EUA).

Submeteram-se os tubos de reação contendo a amostra e a mistura de reagentes à amplificação em termociclador *Eppendorf Gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) como se segue: 2,0 minutos a 95° C para denaturação do cDNA; 1,0 minuto a 94° C, 1,0 minuto a 55° C para anelamento dos *primers*, 1,0 minuto a 72° C para extensão da seqüência repetidos por 40 ciclos e ainda uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Para a revelação dos produtos de amplificação, retirou-se de cada tubo de reação 10,0 µl de amostra e aplicou-se em gel de agarose 1,5% (A 1000, Gibco, EUA), diluído em TAE (tris-acetato-EDTA, Gibco, EUA) contendo 0,8 mg/ml de brometo de etídeo (Invitrogen, CA, EUA) que, em seguida, foi submetida à eletroforese a 80 V.

Os produtos de amplificação resultantes, no tamanho de 347 pares de bases, foram visualizados por transiluminação do gel por raios ultravioleta e o registro

fotográfico obtido através do sistema *Alphaimager*[®] EC (Alpha Innotech Corporation, EUA).

5.1.1.13. Seqüenciamento das amostras positivas

De um total de onze amostras de positivas para a presença do hMPV, oito foram seqüenciadas com sucesso. Todos os segmentos seqüenciados apresentaram similaridade ao hMPV pelo programa *SeqMan* (*Expert Analysis Software* - DNASTar) para PC (Applied Biosystems, Inc., EUA).

Entre as oito amostras seqüenciadas, cinco pertenciam ao grupo A enquanto três pertenciam ao grupo B do hMPV.

5.1.2. Padronização da PCR em tempo real

5.1.2.1. Desenho dos *primers*

Inicialmente, foi selecionada uma região do nucleocapsídeo do genoma do vírus que apresentava um reduzido número de *mismatches* entre as diferentes cepas do hMPV. Nesta região, foram selecionados segmentos de nucleotídeos para serem utilizados no desenvolvimento de *primers* e sonda (figura 10).

As seqüências do *primer nonsense* Care 3 e da sonda apresentaram total similaridade com as diversas cepas de hMPV oriundas de diferentes regiões. No entanto, durante o desenho do *primer sense* (Care 1), observou-se à presença de um *mismatch* entre bases citosina e guanina no nucleotídeo de posição 417. Uma solução prática seria a de incluir nesta posição uma base degenerada C/T, ou seja, uma base que detectasse ambas as bases simultaneamente. No entanto, ao analisarmos esta possibilidade, verificou-se que tal procedimento implicaria num aumento relevante da

temperatura de *melting* do *primer*, não respeitando as temperaturas recomendadas pelo fabricante.

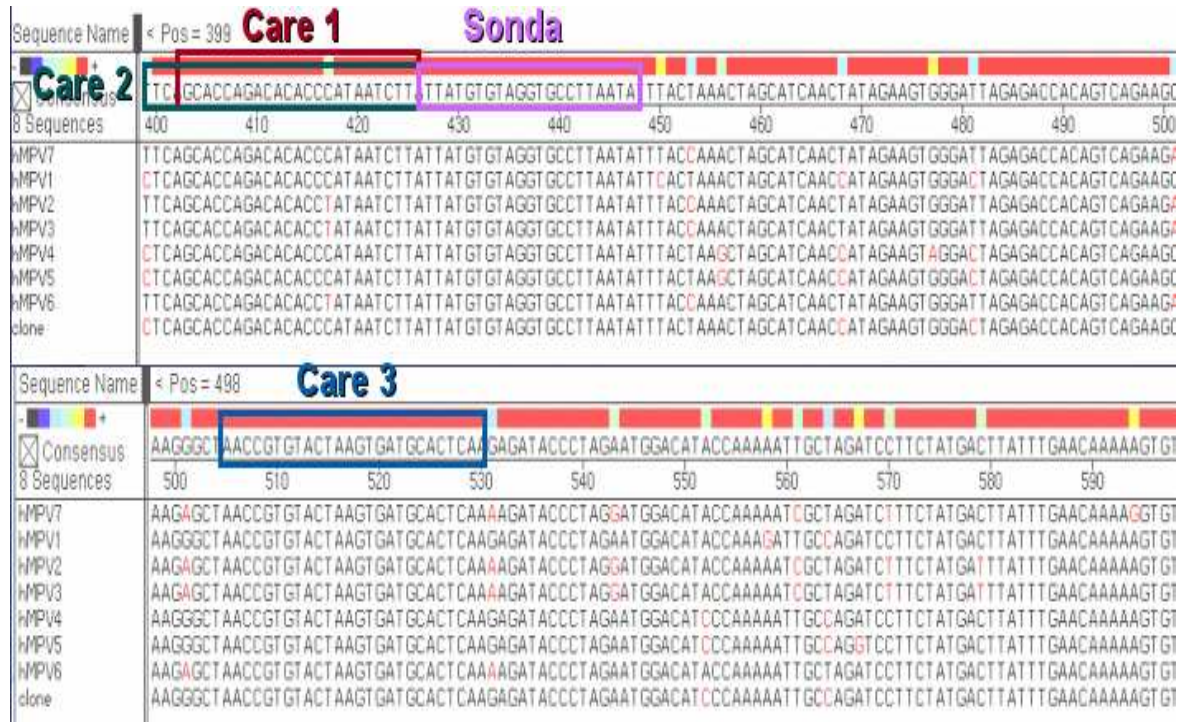


Figura 10: Comparação das similaridades entre *primers* e sonda desenvolvidos a partir da região do nucleocapsídeo em diferentes cepas do hMPV (*Expert Analysis Software - DNASTar*). Care 1 e Care 2: *primers sense*; Care 3: *primer nonsense*; Clone: segmento clonado a partir da cepa ARG-3-02 (Número de acesso *GenBank*: DQ362938); hMPV1: cepa CAN97-83 (n: AY297749); hMPV2: cepa NL/1/99 (n:AY525843); hMPV3: cepa BJ1887 (n:DQ843659) ; hMPV4: cepa protótipo 00-1 (AF371337); hMPV5: cepa CAN99-81 (n: AY145286); hMPV6: genoma completo (NC_004148); hMPV 7: amostra clínica brasileira 1165-8.

Desta forma, optou-se pelo desenvolvimento de dois *primers sense*, um com a base citosina (Care 1) e outro com a base guanina (Care 2), ambos com temperaturas de *melting* próximas (tabela 4). Além disso, foram adicionados à terminação 3' do *primer* Care 2 três bases; timina, citosina e adenina, respectivamente, de modo a aproximar a temperatura de *melting* deste *primer* à do *primer* Care 1.

Tabela 4: Seqüências dos *primers* e sonda em relação à terminação 5' da região do nucleocapsídeo da estirpe protótipo do hMPV.

<i>Primer</i>	Seqüência (5`- 3`)
Care 1	GCACCAGACACACCCATAATCTT
Care 2	TCAGCACCAGACACACCTATAATCTT
Care 3	TTGAGTGCATCACTTAGTACACGGT
Sonda	6FAM-TTATGTGTAGGTGCCTTAATA-MGBFQ

Tais *primers* foram posteriormente diluídos na reação de PCR de modo a apresentarem a mesma concentração. O segmento de nucleotídeos amplificado – *template* – possuía 74 pares de bases.

5.1.2.2. Adequação das características dos *primers* de ao sistema de detecção

As seqüências respeitaram as características exigidas pelo sistema de detecção escolhido, o sistema Taqman[®]/MGB[®] (Applied Biosystems, Inc., EUA) referido em 4.2.5.2.2.. A escolha do sistema de detecção Taqman[®] e da sonda MGB[®] (Applied Biosystems, Inc., EUA) recaiu sobre o fato de este sistema ser mais sensível do que o sistema SBYR Green[®] (Applied Biosystems, Inc., EUA). As características dos *primers* respeitaram as exigências do sistema e estão descritas na tabela 5.

Tabela 5: Características dos *primers* e sonda. T_m – temperatura de *melting*. % GC – presença de bases guanina-citosina em porcentagem. Tamanho – tamanho do segmento em número de nucleotídeos.

<i>Primer</i>	T _m (°C)	% GC	Tamanho (nt)
Care 1	58,9	47,8	23
Care 2	59,1	42,3	26
Care 3	58,8	44,0	25
Sonda	69,3	33,3	21

5.1.2.3. Controle endógeno

Entre as 249 amostras clínicas de lavado de nasofaringe, 228 (91,6%) apresentaram resultados positivos para a presença do gene da hipoxantina fosforribosiltransferase. Portanto, as 21 amostras que apresentaram resultados negativos foram excluídas do estudo.

5.1.2.4. Estimativa do limite de detecção da reação

A espectrometria da alíquota, a qual se chamou de “alíquota-mãe”, indicou uma densidade ótica de 4450 µg/mL, que, pelos cálculos matemáticos efetuados, corresponde a aproximadamente 200 x 10⁹ cópias/mL (ver Apêndice II).

Uma vez estimado o número de cópias de clones/mL, diversas diluições da “alíquota-mãe” foram realizadas: tubo A – “alíquota-mãe” (200 x 10⁹ cópias/mL), tubo B – diluição de 1:10² (200 x 10⁷ cópias/mL), tubo C – diluição de 1:10⁴ (200 x 10⁵ cópias/mL), tubo D – diluição de 1:10⁶ (200 x 10³ cópias/mL), tubo E – diluição de 1:10⁸ (2000 cópias/mL), tubo F – diluição de 1:2 (1000 cópias/mL), tubo G – diluição

de 1:2 (500 cópias/mL), tubo H – diluição de 1:2 (250 cópias/mL), tubo I – diluição de 1:2 (125 cópias/mL), tubo J – diluição de 1:2 (60 cópias/mL), tubo K – diluição de 1:2 (30 cópias/mL) e tubo L – diluição de 1:2 (15 cópias/mL). Realizaram-se em seguida PCR em tempo real padronizada (6.1.2.5.) com as diluições seriadas.

Como mostra a figura 11, a reação foi positiva em todas as diluições exceto no tubo L, correspondente a 15 cópias/mL. Dessa forma, o limite de detecção da PCR em tempo real foi estimado em aproximadamente 30 cópias/mL (tubo K).

Esta reação foi repetida três vezes para os tubos J, K e L. Em todas as reações os resultados se repetiram.

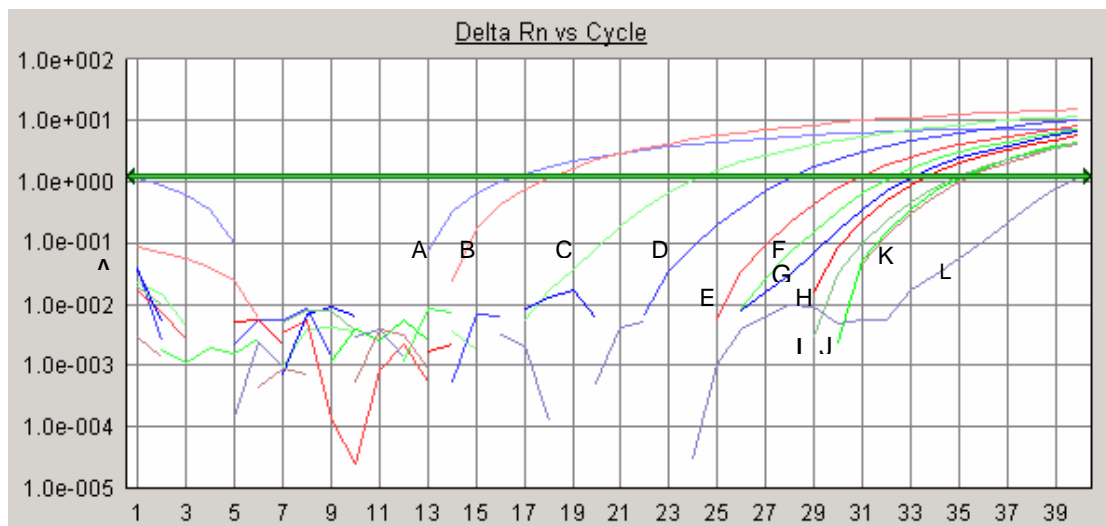


Figura 11: Gráfico referente à estimativa do limite de detecção da PCR em tempo real para hMPV. Cada letra corresponde a diluições do clone de hMPV. A – “alíquota-mãe” (200×10^9 cópias/mL); tubo B (200×10^7 cópias/mL), tubo C (200×10^5 cópias/mL), tubo D (200×10^3 cópias/mL), tubo E (2000 cópias/mL), tubo F (1000 cópias/mL), tubo G (500 cópias/mL), tubo H (250 cópias/mL), tubo I (125 cópias/mL), tubo J (60 cópias/mL), tubo K (30 cópias/mL) e tubo L (15 cópias/mL).

5.1.2.5. Reação de PCR em tempo real padronizada

A seqüência alvo foi amplificada numa reação com volume final de 25,0 µl contendo 5,0 µl de cDNA; 12,5 µl de *Master Mix* (2 X); 1,25 µl dos *primers* Care 1 e Care 2 (10 µM); 2,5 µl do *primer* Care 3 (10 µM); 1,25 µl da sonda (5 µM) e 1,25 µl de água (Invitrogen, CA, EUA).

Submeteram-se os tubos de reação contendo a amostra e a mistura de reagentes à amplificação no termociclador *7300 Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems, EUA) como se segue: 2 minutos a 50° C para ativação da enzima *AmpErase UNG*[®], seguidos de 10 minutos a 95° C para ativação da enzima *AmpliTaQ Gold DNA Polymerase*[®] e 15 segundos a 95° C e 1 minuto a 60° C para anelamento dos *primers* repetidos por 40 ciclos.

5.2. Comparação entre as técnicas de PCR

Entre as 228 amostras de lavado de nasofaringe testadas, 10 (4,4%) foram positivas para a presença do hMPV por ambas as técnicas e 1 (0,4%) foi positiva para a presença do hMPV apenas pela técnica de PCR em tempo real. Se analisarmos os resultados das técnicas separadamente, verificou-se que a técnica em tempo real detectou 11 amostras positivas em 228 (4,8%) - tabela 6.

Tabela 6: Tabela de contingência comparando a concordância entre as técnicas de detecção do hMPV.

		PCR em tempo real		TOTAL
		negativo	positivo	
PCR convencional	negativo	217	1	218
	positivo	0	10	10
TOTAL		217	11	228

Landis JR e Koch GG (1977) sugeriram a seguinte interpretação para os resultados de concordância obtidos através do índice Kappa (tabela 7):

Tabela 7: Valores do índice Kappa e as respectivas interpretações de concordância.

Índice Kappa	Interpretação
< 0	Sem concordância
0 - 0.19	Concordância pobre
0.20 - 0.39	Concordância fraca
0.40 - 0.59	Concordância moderada
0.60 - 0.79	Concordância substancial
0.80 - 1.00	Concordância quase perfeita

A concordância entre as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real foi calculada de acordo com o índice Kappa (Fleiss, 1981). Como o índice Kappa geral calculado foi de 0,95 ($P < 0.001$) no intervalo de confiança de 95%, estimou-se que a concordância entre as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real foi quase perfeita.

As doenças respiratórias são umas das principais causas de morte em todo o planeta. Diversos estudos revistos ao longo deste trabalho demonstram que o metapneumovírus humano (hMPV) é um dos mais importantes vírus encontrados em indivíduos com sintomas respiratórios, podendo em alguns casos levar tais pacientes à complicações graves ou mesmo óbito.

A biologia molecular foi um grande passo dado no universo da pesquisa científica no que diz respeito ao diagnóstico de diversos patógenos humanos. A reação em cadeia por polimerase (PCR) e suas variantes tem sido, desde o isolamento do hMPV (Van den Hoogen, 2001), as mais utilizadas para a detecção do vírus em secreções respiratórias de diferentes grupos de pacientes.

O desenvolvimento de técnicas laboratoriais com elevada sensibilidade e especificidade é essencial para o correto diagnóstico viral, contudo, na ausência de *kits* comercialmente disponíveis, como ocorre no caso do estudo do metapneumovírus humano, pode ocorrer discrepâncias acentuadas nos resultados obtidos entre diferentes laboratórios. Estes dois fundamentos, aliados à necessidade de garantir a reprodutibilidade das técnicas em diferentes grupos de pesquisa, nos conduziram a padronização de duas técnicas de PCR “*in-house*” para o diagnóstico do hMPV em secreções respiratórias.

Não existe, até a presente data, a definição de uma técnica que possa ser considerada padrão-ouro nos estudos envolvendo este vírus. A inexistência da técnica padrão-ouro nos impossibilitou de estimar a sensibilidade e especificidade das

técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real padronizadas durante a execução deste trabalho.

O isolamento do vírus em culturas de células, técnica considerada padrão-ouro para a detecção de grande número de vírus é, no caso do hMPV, de difícil execução e restrita a um pequeno número linhagens celulares (Van den Hoogen *et al*, 2001), restando ainda muitas dúvidas quanto a sua sensibilidade e reprodutibilidade, impedindo sua aplicação como padrão.

Sabe-se ainda que a técnica de isolamento viral não deve ser aplicada como único método de detecção do hMPV. Chan *et al* (2003), em estudo envolvendo isolamento viral do hMPV em secreções respiratórias, realça a importância de que todas as culturas celulares que apresentem efeito citopático sejam submetidas a uma PCR para confirmação do diagnóstico positivo.

Em realidade, ao iniciarmos o isolamento em culturas de células LLC-MK2 com isolados do vírus, enfrentamos tais dificuldades, mesmo recorrendo a protocolos já bem definidos e testados. O efeito citopático mostrou-se muito lento, dependente da adição constante de tripsina e de difícil interpretação. Por este motivo, e pelo fato do isolamento não ser considerado uma técnica padrão-ouro, optamos por não realizar o isolamento viral das amostras clínicas como método de detecção do hMPV.

A comparação entre técnicas de biologia molecular desenvolvidas “*in-house*” e técnicas comerciais possibilitam avaliar o desempenho do método “caseiro” bem como comparar a sua reprodutibilidade. Cabe lembrar que as principais vantagens de

se desenvolver um método caseiro são o custo mais acessível e a disponibilidade imediata de execução da técnica. Contudo, no presente estudo, não pudemos fazer esta comparação pela inexistência de técnicas comerciais para a detecção do hMPV.

Alguns fatores podem ter influenciado os resultados do presente estudo. Em primeiro, a definição dos *primers* a serem utilizados: para padronizarmos a PCR convencional utilizamos *primers* deduzidos de um trabalho teórico de Falsey *et al* (2003) onde o autor não faz referência ao nível de experimentação, enquanto que para padronizarmos a PCR em tempo real realizamos uma cuidadosa comparação nucleotídica entre diferentes cepas do hMPV. Em segundo, a escolha da região do genoma do hMPV a ser utilizada como molde para o desenho dos *primers*: no método convencional utilizamos a proteína de fusão (F) enquanto no método em tempo real utilizamos a proteína do nucleocapsídeo (N) do vírus. Em terceiro, o fato de o método convencional ser mais trabalhoso e de difícil execução pode ter elevado os riscos de erros laboratoriais durante o processamento das amostras clínicas.

Como já salientado anteriormente, o desenho de ensaios de PCR para o diagnóstico virológico deve ter em conta as variações genéticas entre os diferentes grupos do vírus. Pelletier *et al* (2002) demonstraram que técnicas de PCR convencional que utilizem *primers* desenvolvidos a partir da região de fusão do hMPV detectam ambos os genótipos do vírus. Cote *et al* (2003), por sua vez, demonstraram que os genes do nucleocapsídeo e da polimerase do hMPV são os mais indicados para o desenho de *primers* envolvidos em técnicas de PCR em tempo real.

Iniciamos a padronização da técnica de PCR convencional partindo-se de *primers* e protocolos adaptados de trabalho de Falsey *et al* (2003) que já haviam sido testados e recomendados por outros laboratórios de pesquisa de São Paulo. Estes autores desenvolveram uma reação de PCR “one-step” que utilizava como sistema de detecção do produto placas de multi-poços acopladas a um moderno sistema de *software* (ABI Prism 310 Genetic Analyser – Applied Biosystems). Deste modo, houve necessidade de adaptarmos esta etapa da PCR à realidade do nosso laboratório e ao reduzido número de amostras. Para tal, recorreremos à utilização do tradicional sistema de detecção por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

Ao submetermos suspensões de células infectadas por hMPV obtidas por isolamento à reação de PCR convencional inicial (PCR “molde” – ver 4.2.5.1.), esta aferia a presença de uma banda de 347 pares de bases, correspondente ao segmento da proteína de fusão do vírus. No entanto, ao aplicarmos a mesma PCR em amostras clínicas de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas, enfrentamos algumas dificuldades, principalmente no que diz respeito ao ajuste da especificidade da reação, com o constante aparecimento de bandas inespecíficas no gel submetido a eletroforese. Decidimos então, a partir deste contratempo, padronizar a reação de PCR convencional seguindo o roteiro *step-by-step* descrito por Henegariu *et al* (1997).

Entre os diversos ajustes realizados durante a padronização da reação de PCR convencional, o mais importante foi a nosso ver a adição dos co-solventes Glicerol 57% e Vermelho de Cresol 2,5 µg/µl (4.2.5.1.10). Os co-solventes potencializam a desnaturação do *template*, pois se ligam às extremidades das fitas de

DNA facilitando o seu rompimento. Diversos trabalhos comprovaram o aumento da especificidade na técnica de PCR causada pela adição de co-solventes, entre os quais o glicerol (Navaneetham et al, 1998; Paragas et al, 1998; Cândido *et al*, 2000). Além disso, a utilização do reagente Vermelho de Cresol apresenta a vantagem de diminuir o tempo de manipulação pós-PCR, visto que permite a aplicação do produto de reação diretamente no gel de agarose (Navaneetham *et al*, 1998).

A técnica de PCR convencional padronizada neste trabalho detectou a presença do hMPV em lavados de nasofaringe com um limite de detecção de aproximadamente 100 cópias/mL. De modo a confirmarmos a especificidade da técnica, foi realizado seqüenciamento das amostras clínicas positivas à detecção do hMPV. Em todos os casos confirmou-se que a respectiva banda no gel de agarose correspondia a seqüências do metapneumovírus humano.

No tocante ao diagnóstico do hMPV pela técnica de PCR em tempo real, podemos considerar que a padronização envolveu um estudo mais cuidado principalmente durante as etapas de desenvolvimento dos *primers*.

Devemos destacar mais uma vez a importância da escolha de *primers* de regiões conservadas do vírus, que, ao menos teoricamente, devam ser capazes de detectar o hMPV entre os diversos genótipos conhecidos. Foi com base neste critério que, teoricamente, comparamos seqüências de cepas oriundas de diferentes regiões do planeta, inclusive cepa sul-americana, com uma cepa brasileira seqüenciada durante a padronização da reação de PCR convencional. Acreditamos que esta análise nos permitiu desenvolver uma técnica de PCR em tempo real que seja capaz

de detectar diferentes genótipos do hMPV. Entretanto, para comprovar esta hipótese, teríamos que testar amostras de diferentes regiões do Brasil e do mundo, o que não foi feito neste estudo. O desenvolvimento de técnicas que detectem os diferentes grupos do hMPV é de grande importância pois se sabe que os diferentes genótipos do vírus podem co-circular nas mesmas áreas geográficas em determinados anos (Peret *et al*, 2002).

A técnica de PCR em tempo real padronizada neste trabalho detectou a presença do hMPV em lavados de nasofaringe com um limite de detecção de aproximadamente 30 cópias/mL.

Comparando os resultados obtidos entre a técnica de PCR convencional e PCR em tempo real observou-se que a PCR convencional não detectou a presença do vírus em apenas uma amostra clínica que foi positiva pela técnica de PCR em tempo real. Ou seja, de um total de 228 amostras de secreções respiratórias, a técnica convencional detectou 10 (4,4%) amostras positivas em face de 11 (4,8%) amostras positivas detectadas pela técnica de PCR em tempo real. Estes resultados estão, de certo modo, de acordo com o esperado, uma vez que o limite de detecção estimado da PCR em tempo real foi superior ao da estimada para a PCR convencional. Entretanto, quando analisado o índice Kappa geral para o intervalo de confiança de 95%, verificamos que a concordância entre as técnicas foi elevada (0,95), indicando que qualquer uma destas técnicas moleculares pode ser utilizada para a detecção do hMPV.

Em suma, a escolha da técnica de detecção a ser utilizada dependerá do objetivo de cada trabalho e das condições logísticas de cada laboratório. A técnica de PCR convencional, apesar de possuir um custo reduzido quando comparada a PCR em tempo real, apresenta como desvantagens o tempo de execução, a possibilidade de contaminação por manipulação pós-amplificação bem como o fato de não permitir ensaios quantitativos. Por seu lado, a PCR em tempo real, apesar de permitir ensaios quantitativos e de ser de execução mais rápida, ainda é muito cara quando comparada às técnicas convencionais.

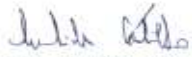
7. Conclusões

Do presente estudo de padronização e comparação de técnicas de PCR para detecção do metapneumovírus humano em secreções respiratórias conclui-se que:

1. as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real padronizadas permitiram a detecção do hMPV em amostras clínicas de lavado de nasofaringe;
2. a concordância entre as duas técnicas medida pelo índice Kappa para um intervalo de confiança de 95% foi de 0,95, ou seja, quase perfeita;

ANEXO I

Consentimento do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da USP

<p>HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO</p> <p>DIRETORIA CLÍNICA</p> <p><u>Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa</u></p> <p>APROVAÇÃO</p> <p>A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29.07.04, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 521/04, intitulado: "Estudo da prevalência do Metapneumovírus Humano (hMPV) em diferentes grupos de pacientes com sintomas de infecção do trato respiratório" apresentado pelo Departamento de MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS.</p> <p>Pesquisador(a) Responsável: Dr. Cláudio Sérgio Pannuti</p> <p>Pesquisador(a) Executante: Dr. Renato dos Reis Oliveira</p> <p>CAPPesq, 29 de Julho de 2004.</p> <p> PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa</p> <p>OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")</p>
--

9. Referências

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1994. "The polymerase chain reaction", p.15.1.1-15.1.4. *In* K Janssen "Current Protocols in Molecular Biology, Vol 2." Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York.

Bachmann B, Luke W, Hunsmann G. "Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents." *Nucleic Acids Res*. 1990 Mar 11;18(5):1309.

Bastien N, Normand S, Taylor T, Ward D, Peret TC, Boivin G, Anderson LJ, Li Y. "Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains". *Virus Research*. 2003;93(1):51-62.

Bastien N, Ward D, Caesele PV, Brandt K, Lee S, McNabb G, Klisko B, Chan E, Li Y. "Human metapneumovirus infection in the Canadian population". *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; Oct: 4642-4646.

Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, Pozzetto B, Ginevra C, Freymuth F. "Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses." *Journal of Virological Methods*. 2005; 126: 53-56.

Biacchesi S, Skiadopoulos M, Boivin G, Hanson , Murphy B, Collins P, Buchholz U. "Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups." *Virology*. 2003; 315:1-9.

Biacchesi S, Skiadopoulos M, Tran C, Hanson , Murphy B, Collins P, Buchholz U. "Recovery of human metapneumovirus from cDNA: optimization of growth in vitro and expression of additional genes." *Virology*. 2004; 321:247-259.

Birnboim HC, Doly J. "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res*. 1979; 24;7(6):1513-23.

Boivin G, Abed Y, Pelletier G, *et al.* "Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute

respiratory-tract infections in all age groups". *Journal of Infectious Diseases* 2002; 186:1330-1334

Boivin G, Coté S, De Serres G, Gilca R, Bergeron MG, Déry P. "Role of human metapneumovirus and other common respiratory viruses in children's hospitalization for acute respiratory tract infections: a two-year study using multiplex PCR." *ICAAC Abstracts*. 2003; Sep 14-17. 43rd.

Boivin G, De Serres G, Cote S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, Bergeron MG, Dery P. "Human metapneumovirus infections in hospitalized children". *Emerging Infectious Diseases*. 2003 Jun;9(6):634-40.

Boivin G, *et al.* "Role of Human metapneumovirus and other common respiratory viruses in children's hospitalization for acute respiratory tract infections: a two-year study using multiplex PCR". Canada. 43rd ICAAC. Abstracts. Chicago. September 14-17, 2003.

Bouscambert-Duchamp M, Iina B, Trompette A, Moret H, Motte J, Andreoletti L. "Detection of human metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analyses". *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; Mar:1411-1414.

Brueggemann AB, *et al.* "PCR detection of respiratory viruses, including human metapneumovirus (hMPV), in > 70% of 315 children with cough and fever". *Inglaterra*. 43rd ICAAC. Abstracts. Chicago. September 14-17, 2003.

Cândido A, Bontempo ED, Resende M. "Polymerase chain reaction amplification of genomic fragments of bovine herpesvirus-1." *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000 Mar-Apr;95(2):225-6.

Cane PA, van den Hoogen BG, Chakrabarti S, Fegan CD, Osterhaus AD. "Human metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease". *Bone Marrow Transplant*. 2003 Feb;31(4):309-10.

Chan PK, Tam JS, Lam CW, Chan E, Wu A, Li CK, Buckley TA, Ng KC, Joynt GM, Cheng FW, To KF, Lee N, Hui DS, Cheung JL, Chu I, Liu E, Chung SS, Sung JJ. "Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome". *Emerging Infectious Diseases*. 2003 Sep;9(9):1058-63.

Chakrabarti R, Schutt CE. "The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides." *Nucleic Acids Research*. 2001 Jun 1;29(11):2377-81.

Cote S, Abed Y, Boivin G. "Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus". *Clinical Microbiology*. 2003 Aug;41(8):3631-5.

Couch RB, Englund JA, Whimbey E. "Respiratory viral infections in immunocompetent and immunocompromised persons". *American Journal of Medicine* 1997; 102:2-9.

Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. "Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil." *Emerging Infectious Diseases*. 2003 Dec;9(12):1626-8.

Defrasnes C, Côté S, Boivin G. "Analysis of replication kinetics of the human metapneumovirus in different cell lines by real-time PCR." *Journal of Clinical Microbiology*. 2005 Jun; 43(1): 488-490.

Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Ishiko H, Hara M, Takahashi Y, Kobayashi K. "Human metapneumovirus infection in Japanese children". *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; Jan:126-132.

Englund J, Boeckh M, Kuypers J, Nichols G, Hackman RC, Morrow R, Fredricks D, Corey L. "Brief communication: fatal human metapneumovirus infection in stem-cell transplant recipients." *Annals of Internal Medicine*. 2006; 144:344-349.

Esper F, Boucher D, Weibel C, *et al.* "Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children". *Pediatrics*. 2003;111(6):1407-10.

Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. "Human metapneumovirus infections in young and elderly adults". *Journal of Infectious Diseases*. 2003 Mar 1;187(5):785-90.

Fleiss L. "Statistical methods for rates and proportions". New York: John Wiley, 1981. p 212-236.

Fleming DM. "The contribution of influenza to combined acute respiratory infections, hospital admissions and deaths in winter". *Communicable disease and public health*. 2000;3:32-8.

Galiano M, Videla C, Puch SS, Martinez A, Echavarria M, Carballal G. "Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina." *Journal of Medical Virology*. 2004 Feb;72(2):299-303.

Gerna G, Vitulo P, Rovida F, Lilleri D, Pellegrini C, Oggioni T, Campanini G, Baldanti F, Revello MG. "Impact of human metapneumovirus and human cytomegalovirus versus other respiratory viruses on the lower respiratory tract infections of lung transplant recipients." *Journal of Medical Virology*. 2006; 78:408-416.

Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. "Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis". *Emerging Infectious Diseases*. 2003 Mar;9(3):372-5.

Hall CB. "Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus". *New England Journal of Medicine*. 2001;344:1917-27.

Han LL, Alexander JP, Anderson LJ. "Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden". *Journal of Infectious Diseases*. 1999;179:25-30.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy GH, Vance G, Vogt PH. "Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol". *Biotechniques*. 1997; 23:504-511.

Jartti T, van den Hoogen B, Garofalo RP, *et al.* "Metapneumovirus and acute wheezing in children". *Lancet*. 2002; 360:1393-1394

Kahn JS. "Human metapneumovirus: a newly emerging respiratory pathogen." *Current Opinion Infectious Diseases*. 2003 Jun;16(3):255-8. Review.

Kahn JS. "Epidemiology of human metapneumovirus." *Clinical Microbiology Reviews*. 2006 Jul;19(3):546-57. Review.

Kumar D, Erdman D, Keshavjee S, Peret T, Tellier R, Hadjiliadis D, Johnson G, Ayers M, Siegal D, Humar A. "Clinical impact of community-acquired respiratory viruses on bronchiolitis obliterans after lung transplant." *American Journal of Transplantation*. 2005;5:2031-2036.

Kuypers J, Wright N, Corey L, Morrow R. "Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real-time RT-PCR". *Journal of Clinical Virology*. 2005;33:299-305.

Landis JR, Koch GG. "The measurement of observer agreement for categorical data." *Biometrics* 1977; 33: 159-174

Larcher C, Geltner C, Fischer H, Nachbaur D, Muller L, Huemer H. "Human metapneumovirus infection in lung transplant recipients: clinical presentation and epidemiology." *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2005; 24(11):1891-1901.

Luchsinger V, Escobar C, Avendaño LF. "Detección de metapneumovirus humano em niños hospitalizados por infección respiratoria aguda baja en Santiago, Chile". *Revista Med. Chile*. 2005; 133:1059-104.

Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D, *et al.* "Molecular assays for detection of human metapneumovirus". *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 41:100-105

Maertzdorf J, Wang C, Brown J, Quinto J, Chu M, Graaf M, Van den Hoogen B, Spaete R, Osterhaus A, Fouchier R. "Real-time reverse transcriptase PCR assay for

detection of human metapneumovirus from all know genetic lineages". *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;Mar:981-986.

Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, Lanini L, Andreoli E, Ragazzo V, Pistello M, Specter S, Bendinelli M. "Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy". *Journal of Clinical Microbiology*. 2003 Jul;41(7):2987-91.

Martino R, Porrás R, Rabella N, Williams J, Rámila E, Margall N, Labeaga R, Crowe Jr J, Coll P, Sierra J. "Prospective study of the incidence, clinical features, and outcome of symptomatic upper and lower respiratory tract infections by respiratory viruses in adult recipients of hematopoietic stem cell transplants for hematologic malignances." *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2005;11:781-796.

McCarthy AJ. "The outcome of 26 patients with respiratory syncytial virus infection following allogeneic stem cell transplantation." 1999. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24(12):1315-1322.

McIntosh K, McAdam AJ. "Human metapneumovirus - an important new respiratory virus." *New England Journal of Medicine*. 2004 Jan 29;350(5):431-3.

Nissen MD, Siebert DJ, Mackay IM, *et al.* "Evidence of human metapneumovirus in Australian children". *The Medical journal of Australia*. 2002; 176:188.

Navaneetham D, Conti-Fine BM. "Augmented PCR amplification by thermally activated DNA polymerase – Amplitaq Gold, in the presence of densifying agents". 1998. Disponível *on-line in* ~<http://astro.temple.edu/~dnavanee/pcr.html>~

Paragas J, Blaho J. "Cosolvents facilitate DNA synthesis in the herpes simplex virus 1 unique short (Us) inverted repeat." *Journal of Virological Methods*. 1998 Jul;73(1):53-8.

Peiris JS, Tang WH, Chan KH, Khong PL, Guan Y, Lau YL, Chiu SS. "Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong". *Emerging Infectious Diseases*. 2003 Jun;9(6):628-33.

Pelletier G, Dery P, Abed Y, Boivin G. "Respiratory tract reinfections by the new human metapneumovirus in an immuno-compromised child". *Emerging Infectious Diseases*. 2002; 8:976-978.

Peret TCT, Boivin G, Li Y, Couillard M, *et al.* "Characterization of human metapneumovirus isolated from patients in North America". *Journal of Infectious Diseases*. 2002; 185:1660-1663

Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR. "Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection". *Journal of Infectious Diseases*. 2003 April 15;187(8):1314-8.

Sarkar G, Kapelner S, Sommer S. "Formamide can dramatically improve the specificity of PCR." *Nucleic Acids Research*. 1990 Dec 25;18(24):7465.

Scheltinga SA, Templeton KE, Beersma MFC, Claas ECJ. "Diagnosis of human metapneumovirus and rhinovirus in patients with respiratory tract infections by an internally controlled multiplex real-time RNA PCR." *Journal of Clinical Virology*. 2005; 33: 306-311.

Stockton J, Stephenson I, Fleming D, Zambon M. "Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness". *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8:897-901

Sumino K, Agapov E, Pierce R, Trulock E, Pfeifer J, Ritter J, Gaudreault-Keener M, Storch G, Holtzman M. "Detection of severe human metapneumovirus infection by real-time polymerase chain reaction and histopathological assessment." *The Journal of Infectious Diseases*. 2005;192(15):1052-1060.

Takao S, Shimozone H, Kashiwa H, Shimazu Y, Fukuda S, Kuwayama M, Miyazaki K. "Clinical study of pediatric cases of acute respiratory diseases associated with human metapneumovirus in Japan". *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2003 Jun;56(3):127-9.

Thanasugarn W, Samransamruajkit R, Vanapongtipagorn P, Prapphal N, Van den Hoogen B, Osterhaus A, Poovorawan Y. "Human metapneumovirus infection in Thai children". *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2003;35:754-756.

Treanor J. "Respiratory infections". In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical Virology*. 1st edition. New York: Churchill Livingstone, 1997. p. 5–33.

Van de Hoogen B, Herfst S, Sprong L, Cane P, Forleo-Neto E, Swart R, Osterhaus A, Fouchier R. "Antigenic and genetic variability of human metapneumovirus." *Emerging Infectious Diseases*. 2004;10(4):658-666.

Van den Hoogen B, Doornum G, Fockens J, Cornelissen J, Beyer W, Groot R, Osterhaus A, Fouchier R. "Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients". *The Journal of Infectious Diseases*. 2003; 188:1571-1577.

Van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. "Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus". *Virology* 2002; 295:119-132.

Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, *et al.* "A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease". *Nature* 2001; 7:719-724.

Van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. "Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection." *Pediatric Infectious Diseases Journal*. 2004 Jan;23 (Sup 1):S25-32.

Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. "High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates". *Journal of Clinical Microbiology*. 2003 Jul;41(7):3043-5.

Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Trallero E. "Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children". *Emerging Infectious Diseases*. 2003 May;9(5):602-3.

Vieira D. "Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações". 2002. Disponível *on-line* in ~<http://www.etall.hpg.ig.com.br/~>

Von Linstow M, Larsen H, Eugen-olsen J, Koch A, Winther T, Meyer A, Westh H, Lundgren B, Melbye M, Hoch B "Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in hospitalized Danish children with acute respiratory tract infection". *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2004;36:578-584.

Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE Jr. "Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children." *New England Journal of Medicine*. 2004 Jan 29;350(5):443-50.

Winship PR. "An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethylsulphoxide." *Nucleic Acids Research*. 1989 Feb 11;17(3):1266.

Zakay-Rones Z, *et al.* "High prevalence of Human Metapneumovirus among young children in Israel". 43rd ICAAC. Abstracts. Chicago. September 14-17, 2003.

Zambon MC, Stockton J, Clewley J, Fleming DF. "Influenza and respiratory syncytial virus: contribution to community cases of influenza-like illness". *Lancet* 2001;358:1410–6.

Zambon MC, Stockton JD, Clewley JP, Fleming DM." Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness: an observational study". *Lancet* 2001;358:1410–6.

APÊNDICE I

Meios de cultivo e manutenção para metapneumovírus humano

- Meio de crescimento de células LLC-MK2:

10,0 ml de Soro fetal bovino 10%

88,0 ml de meio MEM *Earle*

1,0 ml de HEPES 100X

1,0 ml de L-glutamina 100X

1,0 ml de Penicilina-estreptomicina 100X

0,5 ml de Anfotericina-B 200X

- Meio de inoculação de hMPV:

88,0 ml de meio MEM *Earle*

1,0 ml de HEPES 100X

1,0 ml de L-glutamina 100X

1,0 ml de Penicilina-estreptomicina 100X

0,5 ml de Anfotericina-B 200X

- Meio de manutenção de cultivo de hMPV:

88,0 ml de meio MEM *Earle*

1,0 ml de HEPES 100X

1,0 ml de L-glutamina 100X

1,0 ml de Penicilina-estreptomicina 100X

0,5 ml de Anfotericina-B 200X

10,0 ml de Albumina 1%

0,1 ml de Tripsina 1%

0,5 ml de Glucose 100X

APÊNDICE II

Cálculos da estimativa do número de cópias de clones de hMPV da região F (proteína de fusão) na “alíquota-mãe”

Tamanho do fragmento = 347 bp

Tamanho do vetor pGEM-T = 3000 bp

Tamanho do inserto = 3347 bp

Por espectrometria, a concentração da alíquota-mãe foi de 118.900 µg/ml.

Logo,

1 bp ----- 660g (mol)

3347 bp ----- m m = 2,2 x 10⁶ g/mol

6 x 10²³ cópias ----- 2,2 x 10⁶ g

1 cópia ----- x x = 3,7 x 10⁻¹⁸ g/cópia

118.900 µg/ml ~ 118.900 ng/µl

1 cópia ----- 3,7 x 10⁻¹⁸ g

n ----- 118.900 ng n = 3200 x 10¹⁰ cópias/µl

1 µl (alíquota-mãe) ----- 3200 x 10¹⁰ cópias

Passando para cópias/mL:

$$\text{N}^\circ \text{ cópias/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ cópias/}\mu\text{l} \times \text{Volume de eluição do RNA } (\mu\text{l})}{\text{Volume utilizado para extração } (\mu\text{l})} = \frac{3200 \times 10^{10} \times 50}{250}$$

Número de cópias = 640 x 10¹⁰ cópias/mL

Cálculos da estimativa do número de cópias de clones de hMPV da região N (proteína de nucleocápsideo) na “alíquota-mãe”

Tamanho do fragmento = 929 bp

Tamanho do vetor pGEM-T = 3000 bp

Tamanho do inserto = 3929 bp

Por espectrometria, a concentração da alíquota-mãe foi de 4450 µg/ml.

Logo,

1 bp ----- 660g (mol)

3929 bp ----- m m = 2,6 x 10⁶ g/mol

6 x 10²³ cópias ----- 2,6 x 10⁶ g

1 cópia ----- x x = 4,3 x 10⁻¹⁸ g/cópia

4450 µg/ml ~ 4450 ng/µl

1 cópia ----- 4,3 x 10⁻¹⁸ g

n ----- 4450 ng n = 1000 x 10¹⁰ cópias/µl

1 µl (alíquota-mãe) ----- 1000 x 10⁹ cópias

Passando para cópias/mL:

$$\text{N}^\circ \text{cópias/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{cópias/}\mu\text{l} \times \text{Volume de eluição do RNA } (\mu\text{l})}{\text{Volume utilizado para extração } (\mu\text{l})} = \frac{1000 \times 10^9 \times 50}{250}$$

Número de cópias = 200 x 10⁹ cópias/mL

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)