

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Prevalência e aspectos clínicos relacionados aos subgrupos A e B do vírus
respiratório sincicial, em crianças atendidas em Uberlândia, MG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Thelma Fátima de Mattos Silva Oliveira

Uberlândia

2007

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Prevalência e aspectos clínicos relacionados aos subgrupos A e B do vírus
respiratório sincicial, em crianças atendidas em Uberlândia, MG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Thelma Fátima de Mattos Silva Oliveira

Profa.Dra.Divina Aparecida Oliveira Queiróz
(orientadora)

Uberlândia
2007

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Thelma Fátima de Mattos Silva Oliveira

Profa.Dra.Divina Aparecida Oliveira Queiróz
(orientadora)

Uberlândia

2007

À minha mãe, que me incentivou e apoiou, durante todos os passos desse trabalho. Sem você, o caminho seria ainda mais longo. Muito obrigada!

Ao meu pai que em “silêncio” me incentiva e com certeza se alegra com minhas conquistas.

Agradecimentos

À Deus, que nos deu o dom da vida, nos presenteou com a liberdade, nos abençoou com a inteligência e nos deu a graça de lutarmos para a conquista de nossos ideais.

Aos meus pais Maria e Nilton, pelo amor, carinho e por terem me mostrado o início do caminho para a busca do conhecimento.

À minha filha Vitória, por tentar compreender a necessidade da realização deste trabalho.

Ao meu companheiro Ronaldo, pela paciência e compreensão das minhas ausências; e porque me suportou nos momentos de angústia, ansiedade e estresse.

De forma carinhosa à Profa. Dra. Divina A. O. Queiróz, minha grande incentivadora e mais que orientadora de mestrado e de vida, uma parceira da caminhada; pela confiança a mim atribuída e por ter me concedido à honra de tê-la como amiga. Muito obrigada.

Agradeço aos amigos do laboratório que fizeram e fazem parte do nosso grupo de pesquisa, pelo companheirismo, carinho e pela amizade:

- Ao Cláudio Carvalho, pelo auxílio na realização dos primeiros isolamentos na cultura de célula.
- Ao Guilherme Freitas, pela contribuição nos isolamentos e na subgrupagem das amostras.
- À Lysa Nepomuceno, pela dedicação à leitura das lâminas de imunofluorescência e também pela colaboração nas reações de PCR.
- Ao Lucas Ribeiro, pela sua grande contribuição e amizade, pelo auxílio juntamente com a Lysa, no ensaio das últimas amostras quando as minhas forças pareciam exaurir.
- Ao Lourenço Costa, pelo valioso incentivo para que eu cursasse as disciplinas da pós-graduação e pelo processamento de parte das amostras clínicas.
- Ao Bruno Carneiro, pela disposição em me ajudar sempre da melhor forma possível.
- À Tathiane Calegari, pela coleta de espécimes clínicos e pelo empenho e contribuição no levantamento dos dados clínicos.
- À Gabriela Dionísio, pela coleta de espécimes clínicos.
- À Nayhane de Paula, pelo processamento também de parte das amostras clínicas.

- À Renata Costa, pelos momentos agradáveis que passamos juntas.

Ao Dr. Hélio Lopes da Silveira, pelos ensinamentos inestimáveis e pela análise e discussão dos dados clínicos e seleção dos pacientes.

Ao Dr. Orlando Mantese, Dra. Débora Sallum, Dr. Eduardo Roscori, Dr. Francisco C. Diniz e os todos os médicos e residentes do Hospital de Clínicas da UFU, que colaboraram na seleção dos pacientes.

À doutoranda Silvana R. Portes (Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo - Fiocruz/RJ), pela amizade, colaboração e sugestão do protocolo da reação de PCR.

Aos professores Dr. Fábio Oliveira, Dra. Maria Aparecida de Souza e Dra. Valéria Boneti, pelas valiosas sugestões durante a minha qualificação.

Aos secretários do PPIPA João M. Neto e Luceleide Damásio, pela gentileza, atenção e colaboração, disponibilizadas durante esse período.

Aos alunos do Laboratório de Biologia Molecular, Fernanda, Alexandre e Cristiano, obrigada por tudo que fizeram por mim.

Aos responsáveis pelos Laboratórios de Imunologia, Biologia Molecular, Genética Molecular, Fisiologia e Parasitologia por disponibilizarem equipamentos para que parte deste trabalho pudesse ser realizada.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. João Manuel Grisi Candeias (UNESP-Botucatu) e Dra. Maria Aparecida de Souza (UFU-Uberlândia), por aceitarem com presteza, nosso convite para participar da concretização deste trabalho.

À amiga Ana Cristina Recife, pela amizade, e pela força, durante esse período.

Aos familiares, amigos, colegas e professores, que de uma forma ou de outra, cruzaram comigo esta jornada, pelo estímulo e por acreditarem em mim.

E a todas as crianças que participaram deste trabalho.

“Cada pessoa, em sua existência, pode ter duas atitudes: construir ou plantar. Os construtores podem demorar anos em suas tarefas, mas um dia terminam aquilo que estavam fazendo. Então param, e ficam limitados por suas próprias paredes. Os que plantam sofrem com as tempestades, as estações e raramente descansam. Mas, ao contrário de um edifício, o jardim jamais pára de crescer. “E ao mesmo tempo em que exige a atenção do jardineiro, também permite que, para ele, a vida seja uma grande aventura.”

Paulo Coelho

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos:

♂	gênero masculino
ANF	aspirado de nasofaringe
ATCC	American Type Culture Collection
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
DRA	doença respiratória aguda
ECP	efeito citopático
ENF-Ped	Enfermaria de Pediatria
HEp-2	“human larynx carcinoma cells”
IC	intervalo de confiança
IFI	imunofluorescência indireta
IgG	imunoglobulina G
IVAS	infecções das vias aéreas superiores
MAbs	“monoclonal antibodies” (anticorpos monoclonais)
MD	Maryland (EUA)
nm	nanômetro
OR	“odds ratio”

PAP	Pronto Atendimento Pediátrico
pb	pares de base
PS-Ped	Pronto-Socorro de Pediatria
RNA	ácido ribonucléico
RR	risco relativo
RSVAB F	iniciador “forward” para os subgrupos A e B do VRS
RSVAB R	iniciador “reverse” para os subgrupos A e B do VRS
RT-PCR	“reverse transcription of polymerase chain reaction” (transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase)
SEBER	Setor de Berçário
TBE	Tris-Borate-EDTA
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRS	vírus respiratório sincicial

Sumário

Resumo.....	1
Abstract	2
Introdução.....	3
Objetivos	7
Materiais e Métodos.....	8
Pacientes e espécimes	8
Isolamento do vírus respiratório sincicial (VRS) em cultura de células.....	10
Caracterização molecular do VRS	10
Análise estatística dos resultados.....	11
Resultados	12
Discussão.....	17
Conclusões.....	21
Referências bibliográficas	22
Anexo A	27
Anexo B	28
Anexo C	29
Anexo D	30
Anexo E.....	31
Anexo F.....	32

Resumo

O vírus respiratório sincicial (VRS) é referido como o principal agente viral de doença respiratória aguda (DRA) em recém nascidos e lactentes, causando principalmente bronquiolite e pneumonia. Dois subgrupos antigênicos, A e B, são conhecidos, entretanto há divergências a respeito da gravidade da doença causada por esses subgrupos. Para tentar caracterizar 128 amostras de VRS obtidas de crianças menores de cinco anos de idade com DRA, foi utilizada a transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR). Desta maneira, foram subgrupadas 64,1% (82/128) das amostras, sendo 64 VRS A e 18 VRS B. No período de estudo o VRS A predominou sobre o B e em quatro anos observou-se a co-circulação alternada de ambos, sendo o VRS B mais detectado em dois deles. O critério de gravidade foi definido com base nas informações clínicas e nos dados demográficos obtidos das crianças infectadas. Dentre os pacientes com infecção pelo VRS A, a taxa de hospitalização foi de 53,1% (34/64) e para o VRS B de 27,8% (5/18) ($p=0,067$; $OR=2,947$; $RR=1,250$; $IC\ 95\%=0,940-9,235$; mediana de idade: 2,1 e 3 meses, respectivamente). Das crianças infectadas pelo VRS A, 59,4% (38/64) eram <6 meses de idade, enquanto que para o VRS B esse percentual foi de 55,6% (10/18). Todavia, dentre os infectados pelo VRS B nenhum era <1 mês. Aproximadamente 35,0% (29/82) das crianças apresentaram doença de base e prematuridade. Quando se excluiu esses fatores de risco e procedeu à uma análise, observou-se uma taxa de hospitalização de 47,6% (20/42) e 18,2% (2/11), respectivamente para os casos de VRS A e B ($p=0,097$, $OR=4,091$; $RR=1,281$; $IC\ 95\%=0,788-21,249$). Concluindo, não foi observada diferença estatística para gravidade clínica entre os subgrupos do VRS, mas apenas uma tendência de doença mais branda pelo VRS B. Embora pacientes infectados pelo VRS A tenham sido mais hospitalizados do que os infectados pelo VRS B, inclusive os casos sem doença de base e prematuridade, a gravidade da doença não pôde ser atribuída aos subgrupos do VRS.

Palavras chaves:

- vírus respiratório sincicial
- subgrupos
- RT-PCR
- crianças
- gravidade

Abstract

Respiratory syncytial virus is well recognized as the most important pathogen accounting for acute respiratory disease in infants and young children, mainly bronchiolitis and pneumonia. Two major antigenic subgroups, A and B, have been identified; however, there is a disagreement between the severity of the disease caused by them. This study investigated a possible association between RSV subgroups and severity of the cases. Reverse transcription-polymerase chain reaction was used to characterize 128 RSV nasopharyngeal specimens from children less than five years old experiencing acute respiratory disease. It was possible to subgroup 64.1% samples in RSV A (64) and RSV B (18). Severity was measured by clinical evaluation associated with demographic factors. For RSV A-infected patients, 53.1% were hospitalized, whereas for RSV B it was 27.8%. Around 35.0% of the patients presented risk factors for severity. The hospitalization happened for 47.6% of RSV A patients and for 18.2% of RSV B, for children without risk factors. It was observed a trend for RSV B infection to be milder than RSV A. Even though RSV A infected patients were more likely to require hospitalization than those infected by RSV B, including cases without underlying condition and prematurity, the disease severity could not to be attributed to the RSV subgroups.

Introdução

O vírus respiratório sincicial (VRS) é um dos principais agentes responsáveis por atendimentos de emergência e por hospitalizações de lactentes e de crianças de tenra idade em todo o mundo [Sangaré et al., 2006], principalmente devido a quadros de bronquiolites e pneumonias [Kim et al., 1973; Queiróz et al., 2002]. A infecção pelo VRS não produz imunidade duradoura contra subsequente infecção pelo vírus, logo, reinfecções são comuns, sendo que a gravidade dos sintomas diminui proporcionalmente com a idade [Black, 2003]. Sequelas adquiridas através da infecção pelo VRS têm sido observadas e, na maioria das vezes, estão associadas com chiado persistente, aumento da hipereatividade das vias aéreas ou asma atópica [Simoes, 2001].

Praticamente todas as crianças têm a primeira infecção por esse vírus até os dois anos de idade [Parrott et al., 1974], sendo que em 40-50% dos casos há envolvimento do trato respiratório inferior e cerca de 1-2% desses requerem hospitalização [Yun et al., 1995]. Para os prematuros essa porcentagem pode ser maior. Em países desenvolvidos, foi estimado que 0,5-1,5% dos casos hospitalizados com infecção por esse vírus decorre em morte [Ogra, 2004].

O VRS, inicialmente denominado *agente da coriza do chimpanzé*, foi isolado por Morris, Blount e Savage de um chimpanzé em 1956, que apresentava sintomas de doença respiratória aguda. No ano seguinte, na cidade de Baltimore, MD, um vírus semelhante foi isolado de duas crianças, uma com pneumonia e outra com laringotraqueobronquite, sendo então denominado VRS, devido a sua habilidade em formar sincício em linhagens celulares e pela afinidade pelo trato respiratório [Chanock and Finberg, 1957; Chanock et al., 1957]. Já no Brasil, esse vírus foi primeiramente isolado em 1964 [Candeias, 1967].

O VRS pertence à família *Paramyxoviridae*, gênero *Pneumovirus* [VanRegenmortel et al., 2000] e seu genoma é composto de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, não

segmentada, de polaridade negativa, contendo 10 genes. Um total de 11 proteínas são codificadas a partir deste RNA genômico [Cane, 2001], sendo 4 proteínas do nucleocapsídeo (N, P, L, M2-1); 3 glicoproteínas do envelope (G, F, SH); 2 proteínas não estruturais (NS1 e NS2), 1 de matriz (M) e 1 fator regulatório do RNA (M2-2) [Whitehead et al., 1999]. Os genes N e F (fusão) são relativamente bem conservados entre os vírus isolados; em contrapartida o gene G (adsorção) é altamente variável [Cane and Pringle, 1991]. A estrutura do VRS é pleomórfica e seu vírion é composto por um nucleocapsídeo de simetria helicoidal, com diâmetro variando entre 12 e 15nm. O envelope é constituído de dupla camada lipídica com espículas das glicoproteínas F e G, sendo que a estrutura viral completa apresenta de 150 a 300nm [Collins et al., 1996].

O vírus infecta as células epiteliais ciliadas que compõem as vias aéreas [Alberts et al., 1998], sendo que a rápida destruição destas resulta nos sintomas característicos da infecção [Black, 2003] como: febre, rinorréia, tosse e chiado [Park and Barnett, 2002] e possivelmente otite média aguda [Monobe et al., 2003].

Os isolados do VRS podem ser divididos em dois subgrupos, A e B, devido a diferenças antigênicas e genéticas [Anderson et al., 1985; Peret et al., 1998], que resultaram em especulações sobre gravidade e recorrência da doença causada por esses vírus [Straliotto et al., 1994]. Estudos relacionados aos aspectos clínicos associados a cada subgrupo têm produzido resultados limitados e conflitantes [Devincenzo, 2004; Imaz et al., 2000; Siqueira et al., 1991; Walsh et al., 1997]. Entretanto, sugestões terapêuticas e profiláticas têm sido disponibilizadas, e possíveis diferenças entre a gravidade da doença e os subgrupos podem auxiliar nas estratégias de tratamento [Papadopoulos et al., 2004].

Não há até o momento nenhuma vacina eficaz disponível e a terapia com a ribavirina, um análogo sintético da guanosina, tem apresentado modestos resultados [Walsh et al., 1997]. Além disso, crianças de tenra idade tendem a apresentar uma doença mais prolongada e pouca

resposta a medicamentos em geral [Howidi et al., 2007]. Por outro lado, o *palivizumab*, um anticorpo monoclonal humanizado (IgG1K), dirigido contra um epítipo localizado no sítio “A” da proteína F do VRS, tem sido efetivo tanto na redução da incidência quanto da gravidade da infecção pelo vírus, em crianças consideradas de alto risco [Black, 2003] como, prematuras, com doença cardíaca congênita, com condições crônicas do pulmão (fibrose cística ou broncodisplasia pulmonar), e ainda as imunossuprimidas [Welliver, 2003] devido a quimioterapias, transplantes de medula ou órgãos sólidos e aquelas apresentando deficiência de imunidade celular.

Em climas temperados, epidemias pelo VRS ocorrem anualmente nos meses do inverno, enquanto que em climas tropicais, os surtos são associados à estação chuvosa [Cane, 2001]. Entretanto, em climas semitropicais o vírus tem circulado principalmente durante o outono [Costa et al., 2006; Vieira et al., 2001]. Ambos os subgrupos podem circular concomitantemente em cada surto epidêmico e o subgrupo A tem sido o mais prevalente na maioria deles. Vários trabalhos indicam que os subgrupos do vírus alternam em prevalência durante os sucessivos anos [Mufson et al., 1988; Sullender, 2000].

No Brasil, estudos têm identificado a circulação simultânea dos subgrupos em diferentes anos nas regiões norte [Mello and Silva, 1992], nordeste [Moura et al., 2003], sudeste [Cintra et al., 2001; Siqueira et al., 1991] e sul [Stralio et al., 2001], porém nenhum padrão epidemiológico foi estabelecido para Minas Gerais.

Entre 2000 e 2004, a equipe de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) realizou um estudo para detectar os principais vírus envolvidos na doença respiratória aguda (DRA), em crianças menores de cinco anos de idade da região. O VRS foi o agente mais frequentemente identificado, sendo encontrado em 26,4% dos casos investigados [Costa et al., 2006].

Com o propósito de aprofundar o conhecimento sobre o VRS, tentou-se subgrupar em A e B um total de 128 amostras desse vírus, obtidas de crianças com DRA entre 2000 e abril de 2007, e foi investigado se esses subgrupos estariam associados com gravidade, analisando os aspectos clínicos e demográficos dos casos.

Objetivos

1. Subgrupar em A e B os vírus respiratórios sinciciais (VRS) obtidos de aspirado de nasofaringe de crianças menores de cinco anos de idade, com doença respiratória aguda, por transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase;
2. Investigar uma possível associação dos VRS A e B com a gravidade dos casos atendidos no Hospital de Clínicas entre 2000 e abril de 2007;
3. Dar continuidade ao estudo da circulação do VRS na cidade de Uberlândia, MG, pólo de referência para onde se encaminham pacientes de regiões urbanas e rurais circunvizinhas.

Materiais e Métodos

Pacientes e espécimes

Desde abril de 2000, vem-se investigando vírus respiratórios pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) em aspirado de nasofaringe (ANF) de crianças menores de cinco anos de idade, com doença respiratória aguda, atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG. A coleta do ANF recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU (CEP/UFU) (ANEXOS A, B e C).

Após obter o consentimento por escrito dos pais de cada criança (ANEXO D) incluída no estudo, foi preenchido um questionário com os dados clínicos e demográficos (ANEXO E), como idade, gênero, idade gestacional, sintomas clínicos e fatores predisponentes para gravidade, como: imunodeficiência, desordens respiratórias crônicas (broncodisplasia pulmonar e fibrose cística), doença cardíaca congênita e prematuridade. Também foram obtidas informações sobre a necessidade de hospitalização em unidade de terapia intensiva (UTI) e de utilização de ventilação mecânica.

Nesta investigação, também aprovada pelo CEP/UFU (ANEXO F), a avaliação clínica se baseou nos seguintes critérios: sinais e sintomas clínicos, achados laboratoriais, radiografias de pulmão e patologias descritas na 10^a Revisão da Classificação Internacional de Doenças da Organização Mundial da Saúde, de 1994, sendo que os diagnósticos clínicos foram agrupados em bronquiolite, bronquite (que incluiu laringotraqueobronquite, broncoespasmo, “Pertussis like syndrome”, tosse coqueluchóide e bronquite), pneumonia (broncopneumonia e pneumonia) e infecções das vias aéreas superiores - IVAS (otite média aguda, rinite, sinusite, gripe e IVAS).

A hospitalização foi considerada somente para os pacientes que apresentavam doença moderada ou grave.

Os ANF foram coletados no pronto atendimento pediátrico (PAP), no pronto socorro de pediatria (PS-Ped) e nos setores de internação: berçário (SEBER), enfermaria de pediatria (ENF-Ped) e unidade de terapia intensiva (UTI), conforme descrição a seguir. A secreção de nasofaringe foi aspirada através de uma sonda tipo uretral número seis, conectada a uma câmara gotejadora ligada a um sistema de vácuo. Essa sonda foi inserida delicadamente, por rotação, em uma das narinas, paralelamente ao palato, até a região da nasofaringe. Para a coleta do muco da outra narina procedeu-se da mesma maneira. Na presença de pouco muco, instilou-se 0,5mL de soro fisiológico estéril em cada uma das narinas. Imediatamente, o ANF foi transferido para um frasco também estéril e transportado em gelo para o Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU.

Em no máximo quatro horas a amostra clínica foi acrescida de 1 mL de solução salina fosfatada tamponada estéril, homogeneizada e dividida em quatro alíquotas, sendo: (i) uma para a realização da IFI; (ii) duas “in natura” – armazenadas em nitrogênio líquido e em freezer -70°C – para a extração de ácidos nucléicos e estudos futuros e; (iii) a última foi tratada com solução de antibióticos (penicilina: 10.000U/mL + streptomicina: 10.000µg/mL) por 30 minutos em geladeira e combinada com meio de congelamento (10% de dimetilsulfóxido + 90% de soro fetal bovino) numa concentração de 1:2, para posterior inoculação em cultura de células.

A IFI foi realizada para sete vírus respiratórios mediante a utilização do *kit* comercial *Respiratory Panel 1 Viral Screening and Identification Kit* (Chemicon Internacional, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O anticorpo monoclonal (MAb) desse *kit* contra o VRS é específico para a proteína F do vírus. Desta maneira, um total de 128 amostras positivas para o VRS detectado até abril de 2007, constituiu o objeto deste estudo.

Isolamento do VRS em cultura de células

Com o objetivo de amplificar o número de partículas virais para subgrupagem e também para facilitar um futuro seqüenciamento das amostras isoladas do VRS, fez-se a inoculação de 77 espécimes de ANF em linhagens de células HEp-2 (ATCC: CCL-23), como procedido por Queiróz et al [2002].

O sobrenadante, tanto das culturas que apresentaram efeito citopático (ECP), quanto das que não apresentaram, foi coletado e armazenado em freezer -70°C para posterior investigação dos subgrupos A e B do VRS, por transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR). O sedimento foi utilizado para a reação de IFI para confirmação do possível isolamento do VRS. Quando não foi possível isolar o vírus, alíquotas de ANF “in natura” foram testadas diretamente pela RT-PCR, quando disponíveis em estoque.

Entretanto, devido a problemas de contaminação com a linhagem celular e conseqüentemente a exigüidade do tempo, 82 amostras foram testadas diretamente pela RT-PCR a partir dos ANF “in natura”.

Como controles positivos, foram utilizadas as cepas padrão Long e CH18537 dos subgrupos A e B do VRS, respectivamente, gentilmente fornecidas pela Dra. Marilda Siqueira (Fiocruz/Rio de Janeiro, RJ). Essas amostras, foram propagadas na linhagem de células HEp-2 e quando a monocamada apresentou ECP característico, as células foram coletadas e estocadas em freezer -70°C até o uso.

Caracterização molecular do VRS

O RNA viral foi extraído de 250µL do ANF ou de 125µL do lisado celular utilizando-se 750µL ou 375µL, respectivamente de Trizol® (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). O cDNA e a reação de PCR foram desenvolvidos conforme previamente descritos por Stockton et al., 1998. Os iniciadores utilizados para a subgrupagem foram produzidos contra as proteínas N e

P do genoma viral, também de acordo com Stockton et al [1998]. Os iniciadores “RSVAB forward (F), RSVAB reverse (R)” foram utilizados numa concentração de 5pmol durante a primeira amplificação e os “RSVA F, RSVA R, RSVB F, RSVB R” em 25pmol para a reação de *nested* – a TABELA I mostra as seqüências dos iniciadores e a polaridade dos mesmos. Finalmente, 10 µL do produto da PCR foi separado em gel de agarose (Gibco®-BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) em concentração de 1,5% em TBE (Tris-Borate-EDTA: [0,5x]), contendo brometo de etídio 0,5mg/mL e em seguida foi fotografado pelo equipamento ImageMaster®VDS – GE Healthcare. Amostras padrão do VRS (Long e CH18537) e controle negativo (água), correram juntas em cada processo da RT-PCR, com o objetivo de validar a amplificação dos fragmentos e excluir a presença de contaminantes. O tamanho dos fragmentos esperados era de 334pb para o VRS A e 183pb para o VRS B.

Tabela I: Oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR para subgrupagem do VRS

Iniciadores	Sequência (5'-3')	posição do gene	tamanho do fragmento (pb)
1a PCR			
RSVAB F	GTCTTACAGCCGTGATTAGG	N	838
RSVAB R	GGGCTTTCTTTGGTTACTTC	P	
Nested			
RSVA F	GATGTTACGGTGGGGAGTCT	N	334
RSVA R	GTACACTGTAGTTAATCACA	N	
RSVB F	AATGCTAAGATGGGGAGTTC	N	183
RSVB R	GAAATTGAGTTAATGACAGC	N	

Análise estatística dos resultados

Para os resultados obtidos utilizou-se o programa WINKS 4.8a (TexaSoft, Cedar Hill, TX, USA) com nível de significância estatística de 0,05. Variáveis não contínuas foram examinadas utilizando-se o teste exato de Fisher, com intervalo de confiança (IC) de 95%. Para a análise das variáveis dependentes contínuas, o teste não pareado de Mann-Whitney foi utilizado.

Resultados

Utilizando-se a técnica da transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) foi possível caracterizar 64,1% (82/128) das amostras do vírus respiratório sincicial (VRS), sendo que 78% (64/82) delas foram do subgrupo A e 22% (18/82) do subgrupo B. Do total de 128 amostras, 36,0% provieram do pronto atendimento pediátrico, 30,5% do pronto socorro de pediatria e 10,1% do berçário e da enfermaria de pediatria e 23,4% da unidade de terapia intensiva.

Referente aos 77 aspirados de nasofaringe (ANF) inoculados em cultura de células, foi possível isolar e subgrupar o VRS de 38 (49,4%) deles, (VRS A - 27 e VRS B - 11), enquanto que, testando-se as 82 ANF “in natura”, conseguiu-se subgrupar 57,3% (47/82) (VRS A - 40; VRS B - 7) (TABELA II).

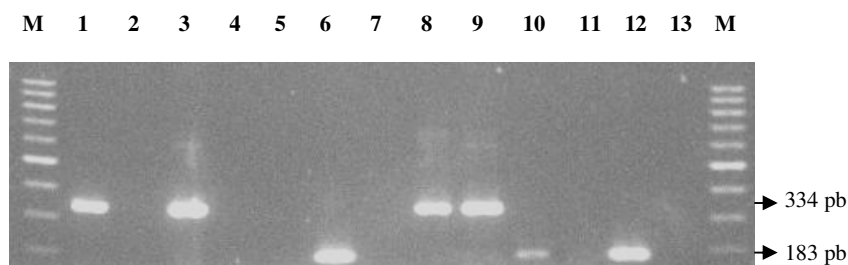
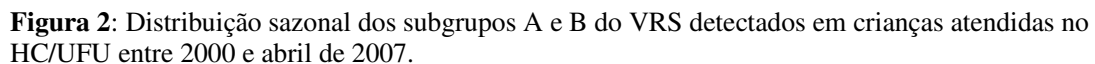


Figura 1: Produtos da transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) obtidos por eletroforese em gel de agarose. **Linha M**, marcador de peso molecular; tamanhos (de cima para baixo) 1000 – 200pb; **Linhas 1 e 8** amostras VRS A; **Linha 10** amostra VRS B; **Linhas 3 e 9** controles positivos VRS A (cepa Long); **Linhas 6 e 12** controles positivos VRS B (cepa CH18537); **Linhas 2, 4, 7, 11, 13** amostras negativas para os subgrupos do VRS; **Linha 5** controle negativo (água).

Inoculadas em HEp-2 (N=77)	“in natura” ANF (N=82)	Subgrupadas
35	NT	35
NT	44	44
3	3	3*
38 (49,4%) [#]	47 (57,3%) [#]	82

Sobre a circulação do VRS, observou-se que houve predomínio do VRS A e que ambos os subgrupos co-circularam alternadamente em quatro anos (2001, 2002, 2003 e 2007), sendo que o VRS B foi mais detectado em 2003 e 2007 (FIGURA 2). De modo geral, esses vírus circularam entre os meses de janeiro e junho – final do verão e final do outono – com pico entre abril e maio. Entretanto, em 2001 foi detectado um caso positivo no mês de agosto e em 2006, outro caso em setembro.



Referente ao gênero, um percentual de 57,8% (37/64) das crianças infectadas pelo VRS A era do sexo masculino, comparado com 44,4% (8/18) pelo VRS B ($p=0,42$) (TABELA III).

Tabela III: Distribuição das idades e gênero dos 82 pacientes atendidos no HC/UFU com doença respiratória aguda, entre 2000 e abril de 2007

Idade (meses)	VRS A			VRS B		
	N	(%)	Gênero (♂)	N	(%)	Gênero (♂)
< 1	9	(14,1)	5	0	(0,0)	0
1-3	18	(28,1)	11	6	(33,3)	3
3-6	11	(17,2)	7	4	(22,2)	2
6-12	10	(15,6)	6	3	(16,7)	2
≥ 12	16	(25,0)	8	5	(27,8)	1
Total	64	(100,0)	37 (57,8)*	18	(100,0)	8 (44,4)*

* $p=0,42$

Em termos da faixa etária, a TABELA III mostra que os casos com infecção pelos VRS A e B apresentaram medianas similares (4,0 e 4,2 meses, respectivamente). Das crianças infectadas pelo VRS A, 59,4% eram menores de seis meses de idade, enquanto que para o VRS B essa taxa foi de 55,6%. Entretanto, para esse último não foi detectado nenhum paciente com idade inferior a um mês.

Em relação às diferentes características clínicas apresentadas pelas crianças, a bronquiolite foi o diagnóstico mais comumente encontrado tanto para o VRS A quanto para o VRS B, ao passo que a pneumonia foi observada somente em uma criança infectada pelo VRS B (TABELA IV).

Tabela IV: Características clínicas e demográficas de acordo com os subgrupos do VRS e os pacientes

	VRS A			VRS B			valor de P	
	N (%)	idade ⁰	gênero (♂)	N (%)	idade ⁰	gênero (♂)	N ¹	idade ²
VRS	64 (78,0)	4	37	18 (22,0)	4,2	8		0,35
Sintomas clínicos								
bronquiolite	30 (46,9)	2	19	6 (33,3)	2,2	4	0,42	0,78
pneumonia	5 (7,8)	6	2	1 (5,6)	4	0	1,00	1,00
bronquite	9 (14,1)	8	6	5 (27,8)	14	2	0,18	0,51
ITRI	20 (31,2)	6	10	6 (33,3)	5,5	2	1,00	0,69
Gravidade clínica								
Leve	29 (45,3)	8	13	12 (66,6)	8,5	5	0,18	0,37
Moderada	18 (28,1)	4,3	13	3 (16,7)	1,6	2	0,38	0,27
Grave	17 (26,6)	2	11	3 (16,7)	4	1	0,54	0,17
Hospitalizados	34 (53,1)	2,1	23	5 (27,8)	3	3	0,07	0,75
Ventilação mecânica	8 (12,5)	1,7	4	1 (5,6)	2,7	0	0,68	0,33
UTI	16 (25,0)	2,1	11	3 (16,7)	4	1	0,54	0,24
Fator de risco³	22 (34,4)	4,5	12	7 (38,9)	3	3	0,78	0,84

⁰: mediana da idade em meses; ¹: Teste exato de Fisher; ²: Mann-Whitney; ³: doença de base e prematuridade; ITRI: infecção do trato respiratório inferior; ♂: sexo masculino.

De acordo com a gravidade clínica, a infecção pelo VRS B apresentou uma tendência de ser mais branda que pelo VRS A (p=0,18) e, com uma exceção, todas as crianças com doença grave eram menores de seis meses de idade (TABELA IV). Além disso, houve registro de óbito de uma criança com infecção pelo VRS A, no nono dia de hospitalização na UTI.

Sobre o requerimento de ventilação mecânica entre os subgrupos (VRS A: 8/64; VRS B: 1/18) e a hospitalização na unidade de terapia intensiva (VRS A: 16/64; VRS B: 3/18), nenhuma diferença estatística foi observada.

Referente à prematuridade e às doenças de base que predispoem à gravidade na infecção por esse vírus, um percentual de 35,4% (29/82) dos pacientes apresentava tais fatores de risco (VRS A: 22/64; VRS B: 7/18). Em adição, 66,7% (26/39) dos casos hospitalizados eram do sexo masculino (VRS A: 23/34; VRS B: 3/5) (TABELA IV).

A FIGURA 4 mostra que 53,1% (34/64) dos pacientes hospitalizados estavam com infecção pelo VRS A e 27,8% (5/18) pelo VRS B ($p=0,067$; $OR=2,947$; $RR= 1,250$; $IC\ 95\%=0,940-9,235$); mediana de idade: 2,1 e 3 meses, respectivamente). Quando se procedeu à análise dos casos sem doenças de base e/ou prematuridade, a taxa de hospitalização para os infectados pelo subgrupo A foi de 47,6% (20/42) e pelo B de 18,2% (2/11) ($p=0,097$, $OR=4,091$ $RR=1,281$; $IC\ 95\%=0,788-21,249$).

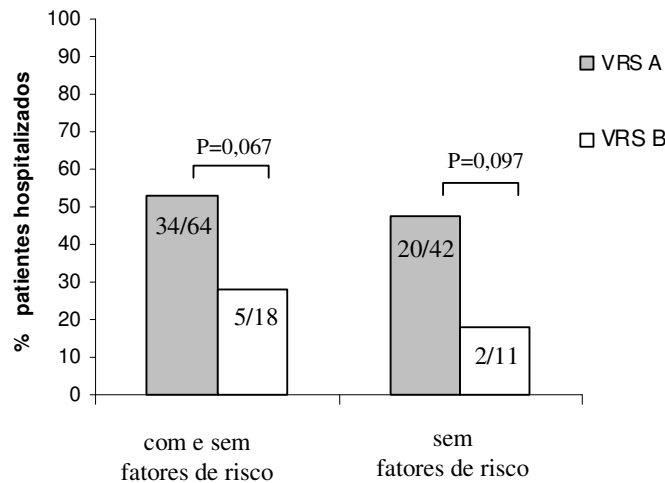


Figura 4: Pacientes hospitalizados no período 2000 a abril de 2007 no HC/UFU, com diagnóstico de infecção pelo VRS A ou B, com e/ou sem fatores de risco, apresentando doença moderada ou grave.

Discussão

Esta é a primeira investigação que busca correlacionar os vírus respiratórios sinciciais dos subgrupos “A” (VRS A) e “B” (VRS B) com dados clínicos e demográficos de crianças menores de cinco anos de idade, com doença respiratória aguda, atendidas em um hospital público do Estado de Minas Gerais.

A habilidade em subgrupar 64,1% dos espécimes clínicos, positivos para o VRS, deve-se a utilização do método de transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), tanto em amostras dos vírus isolados em cultura de células HEp-2, como em aspirados de nasofaringe (ANF) “in natura”.

Utilizando-se a RT-PCR em ANF “in natura” foi possível subgrupar 57,3% das amostras testadas, semelhantemente aos 59,0% obtidos por Papadopoulos et al. [2004], que também utilizaram as mesmas seqüências de iniciadores [Stockton et al., 1998]. Por outro lado, empregando-se esse mesmo método em amostras inoculadas em cultura de células, o percentual de isolamento viral foi de 49,4%.

A despeito do custo elevado da técnica de RT-PCR, o protocolo aqui utilizado demonstrou ser de fácil execução para a subgrupagem das amostras de VRS e permitiu obter algum conhecimento sobre a epidemiologia molecular desses vírus.

O fato de terem sido isoladas somente 49,4% das amostras de VRS em células HEp-2, pode ser devido a alguns fatores tais como: perda da infectividade do vírus ou mesmo dificuldade na replicação dentro das células, que pode ser atribuído ao longo tempo de estocagem dos espécimes. Além disso, tem sido mostrado que cepas do VRS B tendem a “crescer” mais lentamente em cultura de células, podendo inclusive perder a característica de formar sincícios [Hall et al., 1990].

Referente à observação de que o VRS A predominou sobre o VRS B (78% x 22%) está de acordo com a maioria dos estudos de subgrupagem [Martinello et al., 2002; McIntosh

et al., 1993; Savon et al., 2006], embora há cerca de 10 anos na Dinamarca tenha sido referida uma predominância do VRS B [Johansen et al., 1997]. Espécimes não subgrupados também foram relatados por outros autores [Cintra et al., 2001; Stralio et al., 1994; Walsh et al., 1997].

A detecção do VRS B em anos alternados também é concordante com outros estudos [Arbiza et al., 2005; Galiano et al., 2005]. Mufson et al. [1987] sugeriram que uma infecção pela VRS A protege contra reinfecção pelo mesmo subgrupo do vírus no ano seguinte. Neste estudo, acredita-se que o fato de o VRS B não ter sido detectado em 2005, seja devido ao pequeno número de espécimes clínicos coletados naquele ano. Essa diminuição de amostras também ocorreu nos anos seguintes, devido a mudanças político-administrativas implementadas no município, que repercutiram no Hospital de Clínicas. Anderson et al. [1985] descreveram esses dois subgrupos há mais de 20 anos e relataram naquela época a possibilidade de ambos co-circularem durante um surto epidêmico e de apresentarem uma distribuição mundial.

Tem sido observado que o número de indivíduos do gênero masculino com doença grave é maior do que os do gênero feminino [Burr et al., 1993; Queiróz et al., 2002]. Isto também foi observado neste estudo, onde a maioria das crianças com infecção pelo subgrupo A pertencia ao gênero masculino, o que também está de acordo com Sangaré et al. [2006], que relataram que indivíduos do gênero feminino foram mais protegidos contra a hospitalização pelo VRS.

Em concordância com um estudo prévio [Imaz et al., 2000], aqui foi observado que pacientes infectados pelo VRS A apresentavam uma leve tendência de serem mais novos que os pelo VRS B. Além disso, neste estudo as crianças menores de 1 mês de idade foram infectadas somente pelo VRS A, contrariamente ao observado por Papadopoulos et al. [2004], que utilizando médias de idade relataram infecção pelo VRS B em crianças mais jovens.

Com relação às infecções do trato respiratório inferior por este vírus, os resultados aqui obtidos estão de acordo com Garzon et al. [2002], que mostraram que a bronquiolite foi o diagnóstico mais encontrado, seguido pela pneumonia. Achados semelhantes foram também mostrados por outros investigadores [Bakir et al., 1998; Henrickson, 1998; Queiróz et al., 2002; Talbot et al., 2005].

Papadopoulos et al. [2004] utilizando o tempo de hospitalização como um marcador de gravidade, não encontraram diferença significativa entre os subgrupos do VRS. Eles argumentaram que esse parâmetro estaria além de decisões clínicas e, portanto, não poderia ser controlado. Entendendo da mesma maneira, por envolver aspectos clínicos subjetivos, o tempo de internação não foi considerado neste estudo. Todavia, a taxa de hospitalização para os pacientes infectados pelo VRS A foi significativamente mais elevada do que para os infectados pelo VRS B.

Em crianças hospitalizadas menores de um ano, COATES et al. [1963] verificaram que o VRS A causou doença mais grave e foi mais freqüente do que o VRS B. Entretanto, outra investigação diferiu em relação à gravidade da doença [Palomino M. et al., 2004]. Em adição, outros autores não encontraram nenhuma diferença [Cintra et al., 2001; Coggins et al., 1998], o que foi similar ao observado neste estudo.

Também a observação de que os pacientes graves tinham idade inferior a seis meses foi concordante com outros autores [Cintra et al., 2001; Imaz et al., 2000]. O fato de ter sido observado apenas uma tendência de maior gravidade pelo VRS A sobre o VRS B deve-se provavelmente ao reduzido número de amostras ou ainda à subjetividade dos parâmetros selecionados.

Concluindo, não foi observada diferença estatística para gravidade clínica entre os subgrupos do VRS, mas apenas uma tendência de doença mais branda pelo VRS B. Embora pacientes infectados pelo VRS A tenham sido mais hospitalizados do que os infectados pelo VRS B,

inclusive os casos sem doença de base e prematuridade, a gravidade da doença não pôde ser atribuída aos subgrupos do VRS.

Conclusões

1. A técnica de RT-PCR demonstrou ser de fácil execução para a subgrupagem das amostras de VRS.
2. Em Uberlândia, o VRS A circulou em todos os oito anos do estudo e co-circulou com o VRS B em quatro desses anos.
3. Não se observou diferença estatisticamente significativa na gravidade da infecção pelos subgrupos do VRS, mas apenas uma tendência de maior gravidade nas crianças infectadas pelo VRS A.
4. Embora pacientes infectados pelo VRS A tenham sido mais hospitalizados do que os infectados pelo VRS B, inclusive os casos sem doença de base e prematuridade, a gravidade da doença não pôde ser atribuída aos subgrupos do VRS.

Referências bibliográficas

- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1998. Essential cell biology: An Introduction to the molecular biology of the cell. New York:, Garland. 297-300 p.
- Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, McIntosh K. 1985. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 151(4):626-633.
- Arbiza J, Delfraro A, Frabasile S. 2005. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(3):221-230.
- Bakir TM, Halawani M, Ramia S. 1998. Viral aetiology and epidemiology of acute respiratory infections in hospitalized Saudi children. *J Trop Pediatr* 44(2):100-103.
- Black CP. 2003. Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection. *Respir Care* 48(3):209-231; discussion 231-203.
- Burr ML, Limb ES, Maguire MJ, Amarah L, Eldridge BA, Layzell JC, Merrett TG. 1993. Infant feeding, wheezing, and allergy: a prospective study. *Arch Dis Child* 68(6):724-728.
- Candeias JA. 1967. [Isolation of the respiratory syncytial virus from children with acute respiratory infections]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 9(1):27-30.
- Cane PA. 2001. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 11(2):103-116.
- Cane PA, Pringle CR. 1991. Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleotide sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J Gen Virol* 72 (Pt 2):349-357.
- Chanock R, Finberg L. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg* 66(3):291-300.
- Chanock R, Roizman B, Myers R. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* 66(3):281-290.
- Cintra OA, Owa MA, Machado AA, Cervi MC, Figueiredo LT, Rocha GM, Siqueira MM, Arruda E. 2001. Occurrence and severity of infections caused by subgroup A and B respiratory syncytial virus in children in southeast Brazil. *J Med Virol* 65(2):408-412.
- Coates HV, Kendrick L, Chanock RM. 1963. Antigenic differences between two strains of respiratory syncytial virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 112:958-964.

- Coggins WB, Lefkowitz EJ, Sullender WM. 1998. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. *J Clin Microbiol* 36(12):3552-3557.
- Collins PL, McIntosh K, Chanock R. 1996. Respiratory syncytial virus. B.N.FIELD'S DMKPMH, editor. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1313-1351 p.
- Costa LF, Yokosawa J, Mantese OC, Oliveira TF, Silveira HL, Nepomuceno LL, Moreira LS, Dyonisio G, Rossi LMG, Oliveira RC, Ribeiro LZG, Queiróz DAO. 2006. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlandia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(3):301-306.
- Devincenzo JP. 2004. Natural infection of infants with respiratory syncytial virus subgroups A and B: a study of frequency, disease severity, and viral load. *Pediatr Res* 56(6):914-917.
- Galiano MC, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. 2005. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). *J Clin Microbiol* 43(5):2266-2273.
- Garzon LS, Wiles L. 2002. Management of respiratory syncytial virus with lower respiratory tract infection in infants and children. *AACN Clin Issues* 13(3):421-430.
- Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, Anderson LJ. 1990. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis* 162(6):1283-1290.
- Henrickson K. 1998. Henrickson K. Viral pneumonia in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 1998;9:217-33.; Viral pneumonia in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 9:217-233.
- Howidi M, Rajah J, Abushrar Z, Parsons H. 2007. The severity of respiratory syncytial virus bronchiolitis in young infants in the United arab emirates. *J Trop Pediatr* 53(1):22-26.
- Imaz MS, Sequeira MD, Videla C, Veronessi I, Cociglio R, Zerbini E, Carballal G. 2000. Clinical and epidemiologic characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fe, Argentina. *J Med Virol* 61(1):76-80.
- Johansen J, Christensen LS, Hornsleth A, Klug B, Hansen KS, Nir M. 1997. Restriction pattern variability of respiratory syncytial virus during three consecutive epidemics in Denmark. *Apmis* 105(4):303-308.
- Kim HW, Arrobio JO, Brandt CD, Jeffries BC, Pyles G, Reid JL, Chanock RM, Parrott RH. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. *Am J Epidemiol* 98(3):216-225.
- Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS. 2002. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis* 186(6):839-842.

- McIntosh ED, De Silva LM, Oates RK. 1993. Clinical severity of respiratory syncytial virus group A and B infection in Sydney, Australia. *Pediatr Infect Dis J* 12(10):815-819.
- Mello W, Silva C. 1992. Epidemiological aspects of RSV subgroups in Belém, Brazil. *Boletim Latino-americano* 1(8).
- Monobe H, Ishibashi T, Nomura Y, Shinogami M, Yano J. 2003. Role of respiratory viruses in children with acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 67(7):801-806.
- Moura FE, Borges LC, Portes SA, Ramos EA, Siqueira MM. 2003. Respiratory syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description of clinical and epidemiological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(6):739-743.
- Mufson MA, Belshe RB, Orvell C, Norrby E. 1987. Subgroup characteristics of respiratory syncytial virus strains recovered from children with two consecutive infections. *J Clin Microbiol* 25(8):1535-1539.
- Mufson MA, Belshe RB, Orvell C, Norrby E. 1988. Respiratory syncytial virus epidemics: variable dominance of subgroups A and B strains among children, 1981-1986. *J Infect Dis* 157(1):143-148.
- Ogra PL. 2004. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev* 5 Suppl A:S119-126.
- Palomino M. MA, Larenas A J, Moraga A. G, Avendano LF. 2004. Severidad clínica de la infección respiratoria aguda baja primaria por virus respiratorio sincicial grupos A y B. *Revista Chilena de Pediatría* 75(supl.1):18-24.
- Papadopoulos NG, Gourgiotis D, Javadyan A, Bossios A, Kallergi K, Psarras S, Tsolia MN, Kafetzis D. 2004. Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? *Respir Med* 98(9):879-882.
- Park JW, Barnett DW. 2002. Respiratory syncytial virus infection and the primary care physician. *South Med J* 95(3):353-357.
- Parrott RH, Kim HW, Brandt CD, Chanock RM. 1974. Respiratory syncytial virus in infants and children. *Prev Med* 3(4):473-480.
- Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. 1998. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol* 79 (Pt 9):2221-2229.
- Queiróz DAO, Durigon EL, Botosso VF, Ejzemberg B, Vieira SE, Mineo JR, Yamashita C, Hein N, Lopes CL, Cacharo AL, Stewien KE. 2002. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. *Braz J Med Biol Res* 35(10):1183-1193.
- Sangaré L, Curtis MP, Ahmad S. 2006. Hospitalization for respiratory syncytial virus among California infants: disparities related to race, insurance, and geography. *J Pediatr* 149(3):373-377.

- Savon C, Goyenechea A, Valdes O, Aguilar J, Gonzalez G, Palerm L, Gonzalez G, Perez Brena P. 2006. Respiratory syncytial virus group A and B genotypes and disease severity among Cuban children. *Arch Med Res* 37(4):543-547.
- Simoes EA. 2001. Treatment and prevention of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. Long-term effects on respiratory outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 163(3 Pt 2):S14-17.
- Siqueira MM, Nascimento JP, Anderson LJ. 1991. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus group A and B isolates in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 29(3):557-559.
- Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. 1998. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 36(10):2990-2995.
- Straliotto SM, Nestor SM, Siqueira MM. 2001. Respiratory syncytial virus groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(2):155-158.
- Straliotto SM, Roitman B, Lima JB, Fischer GB, Siqueira MM. 1994. Respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis: comparative study of RSV groups A and B infected children. *Rev Soc Bras Med Trop* 27(1):1-4.
- Sullender WM. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev* 13(1):1-15, table of contents.
- Talbot TR, Poehling KA, Hartert TV, Arbogast PG, Halasa NB, Edwards KM, Schaffner W, Craig AS, Griffin MR. 2005. Seasonality of invasive pneumococcal disease: temporal relation to documented influenza and respiratory syncytial viral circulation. *Am J Med* 118(3):285-291.
- VanRegenmortel M, Fauquet C, Bishop D, Carstens E, Estes M, Lemon S, Maniloff J, Mayo M, McGeoch D, Pringle C, Wickner R. 2000. *Virus Taxonomy: the Classification and Nomenclature of Viruses*. 1167 p.
- Vieira SE, Stewien KE, Queiróz DAO, Durigon EL, Torok TJ, Anderson LJ, Miyao CR, Hein N, Botosso VF, Pahl MM, Gilio AE, Ejzenberg B, Okay Y. 2001. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43(3):125-131.
- Walsh EE, McConnochie KM, Long CE, Hall CB. 1997. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J Infect Dis* 175(4):814-820.
- Welliver RC. 2003. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr* 143(5 Suppl):S112-117.
- Whitehead SS, Firestone CY, Karron RA, Crowe JE, Jr., Elkins WR, Collins PL, Murphy BR. 1999. Addition of a missense mutation present in the L gene of respiratory syncytial virus (RSV) cpts530/1030 to RSV vaccine candidate cpts248/404 increases its attenuation and temperature sensitivity. *J Virol* 73(2):871-877.

Yun BY, Kim MR, Park JY, Choi EH, Lee HJ, Yun CK. 1995. Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infections in Korean children. *Pediatr Infect Dis J* 14(12):1054-1059.

Anexo A



Universidade Federal de Uberlândia

COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP -38400-089 ☎ (034) 239 4131 - 235-2078

PARECER COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA N.º 0018/2000

PROJETO DE PESQUISA: “Caracterização molecular de amostras do Vírus Respiratório Sincicial Humano (VRSH) a avaliação da resposta imune em crianças de 0-2 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Divina ª O. Queiroz

INSTITUIÇÃO: -UFU

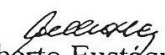
MÉRITO:

De março de 2000 a agosto de 2001 espécimes clínicos serão coletados, de 2ª a 5ª feira, de cerca de 500 crianças de 0-2 anos de idade, atendidas no Hospital de Clínicas em Uberlândia-MG, provenientes da cidade e outras regiões urbanas e rurais da região, após o consentimento expresso dos pais e responsáveis.

PARECER:

O projeto não trará nenhum prejuízo para as pessoas envolvidas. Somos de parecer favorável à sua execução.

Uberlândia 14 de abril de 2000.


Prof. Humberto Eustáquio Coelho
Coordenador do CEP – UFU

Anexo B

Universidade Federal de Uberlândia

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP -38400-089 ☎ (034) 239 4131 - 235-2078

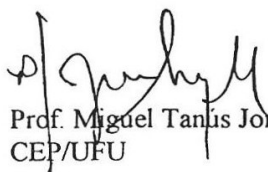
Uberlândia, 24 de setembro de 2001.

Processo nº 018/2000- 2ª fase

PROJETO DE PESQUISA: “Caracterização Molecular de amostras do Vírus Respiratório Sincicial humano (VRS) e avaliação da resposta imune em crianças de 0-2 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Divina aparecida Oliveira Queiroz

O projeto acima identificado, foi **aprovado** para ser realizado conforme os autores se comprometem.


Prof. Miguel Tanús Jorge
CEP/UFU

Anexo C

Universidade Federal de Uberlândia
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP -38400-089 ☎ (034) 239 4131 - 235-2078
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA DE Nº
007/2003

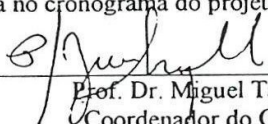
Ilma. Sra.
Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiroz

Uberlândia, 07 de fevereiro de 2003.

Prezada Professora,

Informamos-lhe, que o Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, examinou e **APROVOU** sem restrição de ordem ética, o projeto de pesquisa "*Detecção de vírus respiratórios por reação de polimerização em cadeia (PCR) em secreções de nasofaringe de crianças de 0-5 anos de idade, residentes no Triângulo Mineiro*", cuja vigência será de julho de 2003 a junho de 2005, protocolado sob o número 018/2000 do qual V.Sa. figura como pesquisador responsável.

Em adendo, informamos que o prazo para entrega de relatório final é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96/CNS.



Prof. Dr. Miguel Tanús Jorge
Coordenador do CEP/UFU

IX.2 - Ao pesquisador cabe:

a) apresentar o protocolo, devidamente instruído ao CEP, aguardando o pronunciamento deste, antes de iniciar a pesquisa;

b) desenvolver o projeto conforme delineado;

c) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;

d) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento;

e) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP;

f) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto;

g) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Responsabilidades do Pesquisador:

a) Reafirma-se a responsabilidade indelegável e intransferível do pesquisador nos termos da Resolução 196/96. Da mesma forma, reafirmam-se todas as responsabilidades previstas na referida Resolução, em particular a garantia de condições para o atendimento dos sujeitos da pesquisa.

III - RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

III.1 - Reafirma-se a responsabilidade indelegável e intransferível do pesquisador nos termos da Resolução 196/96. Da mesma forma reafirmam-se todas as responsabilidades previstas na referida Resolução, em particular a garantia de condições para o atendimento dos sujeitos da pesquisa.

III.2 - O pesquisador responsável deverá:

a - Apresentar ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - o projeto de pesquisa completo, nos termos da Resolução, 196/96 e desta Resolução.

b - Manter em arquivo, respeitando a confidencialidade e o sigilo as fichas correspondentes a cada sujeito incluído na pesquisa, por 5 anos, após o término da pesquisa.

c - Apresentar relatório detalhado sempre que solicitado ou estabelecido pelo CEP, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP ou pela Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS/MS.

d - Comunicar ao CEP a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações adversas não esperadas.

e - Comunicar também propostas de eventuais modificações no projeto e ou justificativa de interrupção, aguardando a apreciação do CEP, exceto em caso urgente para salvaguardar a proteção dos sujeitos da pesquisa, devendo então ser comunicado o CEP a posteriori, na primeira oportunidade.

f - Colocar à disposição, do CEP, da CONEP e da SVS/MS toda informação devidamente requerida.

g - Proceder à análise contínua dos resultados, à medida que prossegue a pesquisa, com o objetivo de detectar o mais cedo possível benefícios de um tratamento sobre outro ou para evitar efeitos adversos em sujeitos de pesquisa.

h - Apresentar relatórios periódicos dentro de prazos estipulados pelo CEP havendo no mínimo, relatório semestral e relatório final.

i - Dar acesso aos resultados de exames e de tratamento ao médico do paciente e ou ao próprio paciente sempre que solicitado e ou indicado

J - Recomendar que a mesma pessoa não seja sujeito de pesquisa em novo projeto antes de decorrido um ano de sua participação em pesquisa anterior, a menos que possa haver benefício direto ao sujeito da pesquisa.

Anexo D

Termo de consentimento livre e esclarecido

Pesquisa de vírus respiratórios e aspectos da resposta imune em espécimes clínicos obtidos de crianças de 0-5 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro, MG

Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Sr. Pais/Responsáveis,

Os vírus respiratórios são os principais agentes causadores de doença respiratória aguda em crianças menores de cinco anos de idade, razão pela qual a equipe de Virologia da UFU vem desenvolvendo pesquisa nesse assunto.

A detecção do agente viral que está causando a infecção em seu filho, além de auxiliar o médico a tratá-lo, irá fornecer informações para trabalhos sobre mecanismos de infecção e sobre a circulação dos principais vírus respiratórios em nossa região.

É importante lembrar que a participação neste estudo é voluntária, que o nome de seu filho não será divulgado e que as amostras clínicas não serão utilizadas para nenhum outro estudo.

Se for do seu consentimento a coleta de secreção de nasofaringe (aspirado) e de 2-3mL de sangue de seu filho, favor assinar este documento.

Uberlândia: ____/____/____

Nome do pai/mãe ou responsável: _____

Assinatura: _____

Médicos responsáveis: _____

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

Coordenadora do Projeto:

Profª. Dra. Divina A. O. Queiróz

(34) 3218-2664

Comitê de Ética em Pesquisa da UFU

(34) 3239-4131

Anexo E

FICHA CLÍNICA – PROJETO VÍRUS RESPIRATÓRIOS

Prontuário: _____

Local atendimento: _____ Data: ____/____/____

Data nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Gênero: M F

Duração da gestação: _____ semanas (definir: pré-termo ou termo) Cor: _____

Aleitamento materno: não sim (duração: _____)

Pais fumantes: não sim Pais atópicos: não sim

Doença de base presente (descrever qual patologia apresenta)

Cardiopatia: não sim

Displasia broncopulmonar: não sim

Imunodeficiência: não sim

Outras (definir): não sim

Descrição do quadro clínico

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| ▪ Início dos sintomas: _____ dias | ▪ Dor de garganta: não sim |
| ▪ Febre: _____ dias | ▪ Dor no corpo: não sim |
| ▪ Coriza: _____ dias | ▪ Mal estar: não sim |
| ▪ Tosse: _____ dias | ▪ Secreção ocular: não sim |
| ▪ Espirros: _____ dias | ▪ Hiperemia ocular: não sim |
| ▪ Outros: _____ | |

Frequência respiratória: _____ irpm

Murmúrio vesicular: _____ Chiados (sibilos): não sim

Retrações torácicas (tiragens): não sim

Apnéia ao atendimento (maior 20 seg com cianose ou bradicardia): não sim

Medicação em uso: _____

Rx de tórax: Hiperinsuflação não sim

Consolidação não sim

Atelectasia não sim

Gasometria arterial:	pH=	PaCO ₂ =	PaO ₂ =
	HCO ₃ =	SatO ₂ =	BE=

DIAGNÓSTICO NOSOLÓGICO: _____

Admissão: ____/____/____ Local: _____

Ventilação artificial: não sim (_____ dias)

Anexo F



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 249/05

Registro CEP: 145/05

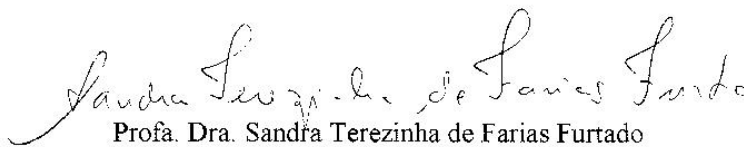
Projeto Pesquisa: *“Correlação entre severidade clínica e infecção pelos subgrupos A e B do vírus respiratório sincicial em crianças atendidas no hospital público de Minas Gerais”*

Pesquisador Responsável: Divina Aparecida Oliveira Queiróz

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado

Uberlândia, 06 de setembro de 2005.


Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.