

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Anticorpos IgG total, IgG1 e IgG3 anti-VRS em crianças ≤ 5 anos de idade:
ocorrência, nível e avidéz**

Guilherme Ramos Oliveira e Freitas

Uberlândia – MG

Fevereiro-2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Anticorpos IgG total, IgG1 e IgG3 anti-VRS em crianças ≤ 5 anos de idade:
ocorrência, nível e avidéz**

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

Guilherme Ramos Oliveira e Freitas (Mestrando)

Prof^ª. Dr^ª. Divina Aparecida Oliveira Queiróz (Orientadora)

Prof^ª. Dr^ª. Deise Aparecida de Oliveira Silva (Co-orientadora)

Uberlândia – MG

Fevereiro-2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F866a Freitas, Guilherme Ramos Oliveira e, 1985-

Anticorpos IgG total, IgG1 e IgG3 anti-VRS em crianças ≤ 5 anos de idade : ocorrência, nível e avidéz [manuscrito] / Guilherme Ramos Oliveira e Freitas. - 2010.

38 f. : il.

Orientadora: Divina Aparecida Oliveira Queiróz.

Co-orientadora: Deise Aparecida de Oliveira Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Virologia - Teses. 2. Imunoglobulinas - Teses. 3. Vírus respiratório sincicial - Teses. I. Queiróz, Divina Aparecida Oliveira. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 578

**"A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original."**

Albert Einstein

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por iluminar meu caminho, guiar meus passos e transmitir coragem durante esta jornada.

Aos meus pais, André Luiz e Mônica, e também ao meu irmão Pedro Luiz, por todo amor, carinho, confiança e incentivo para eu concluir este estudo.

Aos meus avós Pedro e Célia, pessoas por quem tenho grande admiração e as faço meu exemplo de vida.

À Daiane, minha namorada, minha amiga, minha companheira para toda vida, que acompanhou de perto esse período e soube entender meus momentos de angústia, estresse e ansiedade.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Divina Aparecida Oliveira Queiróz, pela oportunidade, orientação, e carinho que juntos possibilitaram a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Deise Aparecida de Oliveira Silva pela co-orientação competente e por ter aberto as portas do Laboratório de Imunoparasitologia.

Aos amigos do Laboratório de Virologia da UFU, Nayhane Tizzo, Lourenço Costa, Bruno Carneiro, Thelma Oliveira, Lysa Nepomuceno, Lucas Zimon, Cynthia Carvalho e Aline, pelos ensinamentos, companheirismo e por tornar o ambiente de trabalho mais agradável e descontraído.

Ao Dr. Hélio Silveira e às enfermeiras Poliana Bonati e Tatianny Calegari que colaboraram na seleção e coleta das amostras dos pacientes.

Aos amigos do mestrado Rosiane, Loyane, Nágilla, Jaqueline, Arlindo, Bia, Juliane, Juliana, Silas, Ana Paula, David e Raquel, pela força e momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia, um obrigado por me aceitarem de forma tão receptiva e pela ajuda nos meus dias “infindáveis” de reações de ELISA.

Aos professores Dr. José Roberto Mineo, Dr^a Maria Aparecida de Souza e Dr. Cláudio Vieira da Silva pelas valiosas sugestões durante minha qualificação.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite (FIOCRUZ – Rio de Janeiro) e Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Souza (UFU - Uberlândia), por aceitarem com presteza nosso convite e pela contribuição na concretização deste trabalho.

A todos os professores do PPIPA que contribuíram para minha formação.

Aos meus grandes amigos Maca, Norival, Roberto, Paulo, Hugo, Paula e Cláudia que desde a época da graduação me apóiam nos momentos difíceis e com quem divido vários momentos felizes.

E a todas as famílias que permitiram que seus filhos participassem deste trabalho.

Lista de abreviaturas e siglas

ABTS	2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazol-6-ácido sulfônico
ACC	agente da coriza do chimpanzé
ANF	aspirado de nasofaringe
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DO	densidade óptica
DP	desvio padrão
DRA	doença respiratória aguda
DTRI	doença do trato respiratório inferior
DTRS	doença do trato respiratório superior
ECP	efeito citopático
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
FIRSV	<i>formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine</i>
HCU	Hospital de Clínicas de Uberlândia
HEp-2	<i>human larynx carcinoma cell</i>
IA	índice avidéz
IE	índice ELISA
IFI	imunofluorescência indireta
IgG	imunoglobulina G
MAbs	<i>monoclonal antibodies</i>
N ₂ L	nitrogênio líquido
PBS	salina tamponada com fosfatos
RNA	ácido ribonucléico

RT-PCR	reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa
SFB	soro fetal bovino
TLRs	<i>Toll like receptors</i>
UFP	unidades formadoras de placa
VRS	vírus respiratório sincicial

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL e MÉTODOS.....	9
3.1 Pacientes e amostras clínicas.....	9
3.2 Controles.....	10
3.3 Preparação e titulação do antígeno viral.....	10
3.4 Detecção e avidéz de anticorpos IgG anti-VRS.....	11
3.4.1 ELISA indireta e ELISA avidéz para IgG total anti-VRS.....	12
3.4.2 ELISA indireta e ELISA avidéz para IgG1 e IgG3 anti-VRS	13
3.5 Análise estatística.....	14
4 RESULTADOS.....	15
5 DISCUSSÃO.....	21
6 CONCLUSÕES.....	25
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
ANEXO A.....	34
ANEXO B.....	35
ANEXO C.....	36
ANEXO D.....	37
ANEXO E.....	38

RESUMO

O vírus respiratório sincicial (VRS) é referido como o principal agente responsável por doença respiratória aguda (DRA) em recém-nascidos e lactentes, causando principalmente bronquiolite e pneumonia. Desde a década de 1960, aspectos da resposta imune contra esse vírus vêm sendo intensamente estudados, entretanto, características que podem levar à proteção contra a infecção ou agravamento do quadro clínico ainda permanecem desconhecidas. O presente trabalho teve como objetivo investigar, tanto a ocorrência e os níveis, quanto a avidéz dos anticorpos IgG total e subclasses IgG1 e IgG3 específicos ao VRS, por ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA indireta e ELISA avidéz, em amostras de soro de crianças ≤ 5 anos de idade com DRA causada pelo VRS (casos) e sem DRA (controles). Uma possível associação entre avidéz e gravidade da doença também foi estudada. A ocorrência e os níveis dos anticorpos específicos ao VRS foram idade dependentes, corroborando com observações anteriores de que crianças < 3 meses de idade possuem alta prevalência e altos níveis de anticorpos maternos e que ≥ 2 anos apresentam aumentada resposta de anticorpos contra reinfecções. Os resultados da análise de avidéz de IgG total e IgG1 anti-VRS demonstraram que as crianças < 3 meses de idade com DRA apresentavam anticorpos de menor avidéz quando comparados com as da mesma faixa etária sem DRA. Enquanto que, crianças ≥ 2 anos com doença do trato respiratório inferior (DTRI) apresentaram IgG total anti-VRS de menor avidéz que aquelas com doença do trato respiratório superior (DTRS) - que apresentaram anticorpos de alta avidéz. Esses resultados sugerem que anticorpos IgG anti-VRS de alta avidéz podem estar relacionados à proteção contra doença pelo VRS em crianças < 3 meses e dessa forma, crianças com IgG materno anti-VRS de alta avidéz podem apresentar menor probabilidade de desenvolver doença. Sugerem também que crianças ≥ 2 anos de idade com IgG anti-VRS de baixa avidéz tenderiam a desenvolver doença respiratória mais grave.

Palavras chave:

vírus respiratório sincicial

crianças ≤ 5 anos de idade

doença respiratória aguda

anticorpos IgG total, IgG1 e IgG3

ensaio de avidéz

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is well recognized as the most important pathogen accounting for acute respiratory disease (ARD) in infants and young children, mainly bronchiolitis and pneumonia. Since the 1960s, aspects of the immune response to RSV have been intensively studied, however, some characteristics that may lead a protection against the infection or severity of the illness are still unknown. This study aimed to investigate the occurrence, levels and avidity of total IgG, IgG1 and IgG3 specific to RSV by indirect enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) and avidity ELISA in serum samples from children ≤ 5 years old with RSV-ARD (cases) and without ARD (controls). Also a possible association between the antibody avidity and severity of the disease was examined. The occurrence and levels of RSV-IgG were age dependent, corroborating to previous observation that infants <3 months old show high prevalence and levels of maternal antibodies and the responsiveness capacity of children ≥ 2 years old to reinfections. The results of RSV-specific total IgG and IgG1 avidity demonstrated that cases <3 months old show low avidity antibodies when compared with age-matched controls. While children ≥ 2 years old with lower tract respiratory illness (LTRI) showed lower RSV-specific total IgG avidity than those with upper tract respiratory illness (UTRI). These results suggest that the high avidity of RSV-specific IgG may be related to protection against RSV disease in children <3 months old and thus, children with high avidity maternal RSV-specific IgG may have a lower probability of developing disease. They also suggest that children ≥ 2 years old with low avidity RSV-specific IgG showed tendency to develop severe RSV-illness.

KEYWORDS:

respiratory syncytial virus

young children

acute respiratory disease

total IgG, IgG1 and IgG3 antibodies

avidity assay

1. INTRODUÇÃO

As doenças do trato respiratório inferior (DTRI) constituem importante causa de morbidade e mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade, sendo o vírus respiratório sincicial (VRS) considerado o principal agente envolvido nesses quadros clínicos (FLEMING et al., 2005; FLEMING et al., 2007). Anualmente, surtos epidêmicos de bronquiolite e pneumonia causados por esse vírus são registrados em todo o mundo, acometendo principalmente neonatos e crianças de tenra idade (COSTA et al., 2006; BERGER et al., 2009; DI CARLO et al., 2009).

Praticamente todas as crianças têm a primeira infecção pelo VRS nos primeiros dois anos de vida (GLEZEN e DENNY, 1973), sendo o pico de incidência entre os menores de seis meses (NOKES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008) que podem desenvolver doença grave e necessitar de hospitalização (GLEZEN et al., 1986). Além desses casos, crianças com doença cardíaca congênita, doenças pulmonares crônicas, imunocomprometidas e prematuras, também são tidas como grupo de risco (WELLIVER, 2003; BERGER et al., 2009; DI CARLO et al., 2009).

O VRS, denominado inicialmente de *agente da coriza do chimpanzé (ACC)*, foi isolado pela primeira vez no ano de 1956, de um chimpanzé que apresentava sintomas de doença respiratória aguda (BLOUNT et al., 1956). No ano seguinte, Chanock et al. (1957) isolaram um agente semelhante de crianças com DTRI, sendo então denominado VRS devido sua afinidade pelo trato respiratório e capacidade de formar sincícios em culturas celulares.

O vírus pertence à família *Paramyxoviridae*, gênero *Pneumovirus*, possui envelope derivado da membrana plasmática da célula hospedeira e genoma do tipo RNA de fita simples linear, de polaridade negativa, contendo 10 genes (COLLINS et al., 2007; MELERO, 2007). Esses genes são transcritos seqüencialmente em distintos RNAs mensageiro e, subseqüentemente, traduzidos em 11 proteínas, sendo quatro proteínas do nucleocapsídeo (N,

P, L, M2-1); três glicoproteínas do envelope (G, F, SH); duas proteínas não-estruturais (NS1 e NS2); uma de matriz (M) e um fator regulatório de RNA (M2-2) (MELERO, 2007).

Utilizando-se anticorpos monoclonais (MAbs) ou técnicas moleculares como a reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), os isolados do VRS podem ser divididos em dois grupos antigênicos, A e B, que por sua vez se subdividem em outros diferentes genótipos (ANDERSON et al., 1985; PERET et al., 2000; ARBIZA et al., 2005). Alguns trabalhos especulam a correlação entre o grupo e/ou genótipo infectante do vírus com a gravidade da doença (PAPADOPOULOS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008), porém os dados encontrados ainda são insuficientes para uma conclusão.

Surtos epidêmicos geralmente ocorrem anualmente em intervalos regulares, embora picos difiram nas diversas partes do mundo (COSTA et al., 2006; BERGER et al., 2009; DI CARLO et al., 2009). Esses surtos são causados por diferentes genótipos do vírus que conseguem co-circular em uma mesma região, com predominância de um grupo a cada epidemia (ARBIZA et al., 2005). Essa alternância anual entre os diferentes grupos e cepas do VRS é considerada uma conseqüência da pressão seletiva da resposta imune desenvolvida pela população em um surto prévio, sendo que a falta de imunidade contra uma *nova* cepa, pode contribuir na transmissão mais eficiente do mesmo e gravidade da doença respiratória (CANE e PRINGLE, 1995; PERET et al., 2000).

A resposta imunológica desenvolvida contra o VRS há muito vêm sendo investigada (HENDERSON et al., 1979; FERNALD et al., 1983; MEURMAN et al., 1984). Sabe-se que a resposta imune humoral contra esse vírus, detectada através de anticorpos presentes no soro e mucosas, possui um importante papel protetor e que seu desenvolvimento é dependente da idade (OPENSHAW, 2002; PIEDRA et al., 2003). Tipicamente são produzidos anticorpos IgM, IgA (sérica e de mucosa), IgE e IgG (WELLIVER, 2008). Embora a infecção por VRS induza a produção de anticorpos contra uma grande variedade de proteínas virais, apenas

aqueles específicos às proteínas F e G do envelope viral apresentam capacidade neutralizante e por isso conferem maior proteção contra doença grave (TAYLOR, 2007).

A produção de anticorpos contra uma infecção primária em crianças nos primeiros meses de vida é relativamente menor, quando comparada com a desenvolvida por crianças maiores de seis meses (WELLIVER, 2008). Baixos níveis de IgM anti-VRS são detectados nessas crianças, e usualmente persistem por cerca de 1 a 3 meses após a infecção (OGRA, 2004). Já a produção de IgA sérica, segundo esses mesmos autores, ocorre vários dias após o início da infecção, enquanto que nas mucosas tem um pico de produção entre o 8º e 13º dia. Alguns estudos têm demonstrado que a produção de IgE anti-VRS está ligada, pelo menos em parte, à patogenicidade da infecção, principalmente em crianças com predisposição à alergias (GRAHAM et al., 2000; WELLIVER, 2008).

Anticorpos IgG anti-VRS podem ser detectados na maioria dos pacientes, principalmente os das subclasses IgG1 e IgG3 (WELLIVER et al., 1980; HORNSLETH et al., 1985; QUEIRÓZ et al., 2002). Até por volta dos 6 meses de idade, as crianças apresentam anticorpos maternos anti-VRS (QUEIROZ et al., 2002) e que segundo Wong e Ogra (1986) são transferidos principalmente via placenta. Tem sido sugerido que a produção ativa de anticorpos específicos em resposta à infecção primária está inversamente relacionada com o título de anticorpos neutralizantes, de origem materna (SHINOFF et al., 2008). Por outro lado, altos níveis de anticorpos IgG maternos com capacidade neutralizante desempenham um papel fundamental no padrão sazonal do VRS e podem proteger contra hospitalizações (STENSBALLE et al., 2009a; STENSBALLE et al., 2009b). Em casos de reinfecções, um efeito re-estimulatório é notado pela produção de altos níveis de IgG detectáveis nos primeiros 5 a 7 dias após o aparecimento dos sintomas (WELLIVER et al., 1980). Apesar de todos os avanços em termos da resposta imune, até o momento não existe vacina eficaz disponível contra esses vírus (CROWE, 2001; KARRON et al., 2005).

A primeira tentativa de imunização contra o VRS foi realizada na década de 1960, utilizando-se uma vacina constituída de partículas virais inativadas por formalina e denominada classicamente de FIRSV (CHIN et al., 1969; KAPIKIAN et al., 1969; KIM et al., 1969). Contudo, cerca de 80% das crianças vacinadas, ao contraírem infecção pelo vírus selvagem no surto seguinte, desenvolveram um quadro de exacerbação da doença respiratória, caracterizada por broncoconstrição e pneumonia grave. Também foram registrados dois casos de óbito atribuídos a essa infecção (KIM et al., 1969). Estudos subseqüentes caracterizaram o fenótipo imune desencadeado pela FIRSV demonstrando que, apesar de imunogênica, a vacina induziu à produção de anticorpos sem capacidade neutralizante, os quais formavam imunocomplexos que acabaram depositados nos tecidos afetados (BUENO et al., 2008).

Durante décadas, a principal teoria aceita atribuía a falha da FIRSV à quebra de epítomos antigênicos chave durante o processo de inativação da vacina, os quais seriam imprescindíveis à indução de uma resposta imune efetiva (PRINCE et al., 1986; MURPHY e WALSH, 1988; MOGHADDAM et al., 2006). Entretanto, Delgado et al. (2009) recentemente demonstraram que a falha no processo de maturação por afinidade de anticorpos, devido a baixa estimulação de receptores *Toll-like* (TLRs), desencadeou a exacerbação da doença respiratória, sugerindo que a maturação da resposta imune seria essencial para proteção contra o VRS. No mesmo estudo, também foi estabelecida a correlação entre avides de anticorpos e capacidade neutralizante, sendo que anticorpos de alta avides apresentariam maior capacidade protetora contra a infecção pelo VRS.

Segundo Meurman et al. (1992), durante uma infecção aguda, a maturação da resposta imune é caracterizada por alterações quantitativas e qualitativas nos anticorpos específicos, que incluem mudanças na distribuição das classes de imunoglobulinas bem como o aumento da afinidade ou avides entre antígeno e anticorpo. Durante as infecções primárias, o estímulo antigênico induz inicialmente a produção de anticorpos específicos de baixa avides (ABBAS,

2007). No caso de infecções secundárias ou reinfecções, ocorre produção rápida de anticorpos específicos de alta avidéz e em títulos elevados (ABBAS, 2007).

Os primeiros protocolos para avaliação da avidéz de IgG baseavam-se em técnicas de competição por afinidade (UNDERWOOD, 1988) ou em análises matemáticas de curvas de titulação resultantes de ensaios imunoenzimáticos (LEHTONEN e VILJANEN, 1982). Atualmente, técnicas simples de ELISA são empregadas para avaliar a avidéz de anticorpos específicos, incluindo-se agentes desnaturantes nos tampões de lavagem, os quais dissociam as ligações antígeno-anticorpo de baixa avidéz. Estas técnicas auxiliam no diagnóstico laboratorial de infecções agudas causadas por diferentes agentes, como os rotavírus, o vírus da rubéola e o *Toxoplasma gondii* (INOUYE et al., 1984; ENDERS e KNOTEK, 1989; TANYUKSEL et al., 2004). Também são utilizadas na distinção entre infecções primárias recentes, de reinfecções ou de reativação (DE SOUZA et al., 2004; BÉLA et al., 2008; MANHANI et al., 2009) assim como na avaliação da eficácia vacinal (PAUNIO et al., 2000; PANNUTI et al., 2004).

Dessa forma, entende-se que o estudo da avidéz de anticorpos IgG anti-VRS em crianças com doença respiratória aguda (DRA) causada pelo VRS, pode contribuir para a caracterização da resposta imune humoral a esse vírus. Assim, investigou-se a ocorrência e o nível de anticorpos IgG total e subclasses IgG1 e IgG3 anti-VRS, bem como sua avidéz em amostras séricas de crianças ≤ 5 anos com DRA e em controles.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a presença e a avidéz de anticorpos IgG anti-VRS em amostras de soro de crianças ≤ 5 anos de idade, com DRA e controles.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a ocorrência e os níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG3 anti-VRS por ensaio imunoenzimático do tipo ELISA indireta, em amostras séricas de crianças ≤ 5 anos de idade com DRA e controles;
- Determinar a avidéz dos anticorpos IgG anti-VRS presente nessas amostras, por meio de ensaio imunoenzimático do tipo ELISA avidéz;
- Investigar uma possível associação da avidéz dos anticorpos IgG anti-VRS com a gravidade dos casos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes e amostras clínicas

No ano 2000, iniciou-se a coleta paralela de amostras de sangue total e de aspirado de nasofaringe (ANF) de crianças atendidas no Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU), para investigação da presença de vírus respiratórios e aspectos da resposta imune contra o VRS. Após o consentimento expresso dos pais ou responsável (ANEXO A) e preenchimento de ficha clínica pelo pediatra (ANEXO B), foi realizada a coleta de aproximadamente 2ml de sangue total e 1ml de ANF, como descrito previamente por Oliveira et al. (2008), e imediatamente transportados em gelo para o Laboratório de Virologia da UFU, onde foram processados.

O processamento e armazenamento dessas amostras foram realizados conforme Queiróz et al. (2002), no período máximo de quatro horas após a coleta. Uma das alíquotas de ANF foi destinada à realização do teste de imunofluorescência indireta (IFI - Respiratory Panel I Viral Screening and Identification Kit, Millipore, Bradford, MA, USA) para investigação de sete vírus respiratórios: VRS, influenzavírus A e B (FLU A e B), parainfluenzavírus 1, 2 e 3 (PIV 1, 2 e 3) e adenovírus (AdV).

Após a coagulação do sangue total, o mesmo foi centrifugado a 2.500 x g por 5 minutos a 25°C, para separação das células sanguíneas do soro. As amostras de soro foram então alíquotadas e armazenadas em freezer -20°C e -70°C até serem utilizadas nos ensaios imunoenzimáticos.

No presente estudo foram incluídas 104 amostras de soro de pacientes com DRA causada pelo VRS (casos). A utilização dessas amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), atendendo a resolução nº 196/1996/CNS (ANEXO C).

Esses pacientes possuíam idade igual ou inferior a cinco anos e quadro clínico de DRA com evolução máxima de cinco dias, caracterizada por coriza, tosse, sibilos e/ou dificuldade respiratória, com ou sem febre. Os diagnósticos clínicos foram classificados em: i) doença do trato respiratório superior (DTRS), quando as crianças apresentaram otite média aguda, rinite, sinusite, resfriado e gripe; ii) doença do trato respiratório inferior (DTRI), nos casos de bronquiolite, bronquite, pneumonia e broncopneumonia.

3.2 Controles

Foram também incluídas no estudo, 66 amostras de soro de crianças sem sinais clínicos de doença respiratória aparente, utilizadas como grupo controle. A coleta desses espécimes recebeu parecer favorável do CEP/UFU atendendo a resolução nº 196/1996/CNS (ANEXOS D e E). Após autorização dos pais ou responsável, uma alíquota de até 2ml de sangue total foi adquirida de coleta para outros exames e encaminhada ao Laboratório de Virologia. As amostras eram provenientes de recém-nascidos (de até dois dias), pacientes acidentados, cardiopatas, ou que foram submetidos à avaliação de rotina. Não foi investigada infecção inaparente nessas crianças, porém mais de 70% das amostras foram coletadas fora do período de circulação do VRS.

3.3 Preparação e titulação do antígeno viral

Amostras-padrão do VRS subgrupo A (cepa Long – clone VR 26, ATCC, Manassas, VA, USA) e B (cepa CH18537 – clone VR 1580, ATCC) foram cultivadas em linhagem celular HEp-2 (células de carcinoma de laringe humano – clone CCL 23, ATCC) com o objetivo de serem utilizadas como antígeno viral nas reações de detecção de anticorpos específicos contra o VRS. Resumidamente, as cepas virais foram inoculadas separadamente em monocamadas celulares e mantidas em meio de cultura DMEM (Gibco, Paisley, UK) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB - Gibco), 1% de L-glutamina (Gibco), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 0,1% de anfotericina B (Eurofarma, São Paulo, SP,

BR). Após a detecção de efeito citopático (ECP) inicial - cerca de 15% da monocamada, o meio de cultivo celular foi substituído por outro livre de SFB, seguida de nova incubação por 2-3 dias. Ao visualizar ECP avançado (75%), as células infectadas foram coletadas, com o auxílio de um *cell scraper*, e submetidas rapidamente a três ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido (N₂L) e banho-maria a 37°C, respectivamente. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 3.800 x g por 10 min a 4°C, coletado o sobrenadante, alíquotado e estocado em freezer -70°C.

Paralelamente, foram cultivadas e processadas, sob as mesmas condições anteriormente descritas, culturas de células HEp-2 não infectadas, para serem utilizadas como antígeno controle das reações imunoenzimáticas.

A titulação viral foi realizada conforme descrito por Trépanier et al. (1980). Alíquotas das cepas-padrão foram inoculadas, separadamente e em duplicata, em diluições seriadas de base dez (1:10³ a 1:10¹²), em monocamadas de células HEp-2 cultivadas com meio DMEM (Gibco) acrescido de 5% SFB (Gibco), 1% de L-glutamina (Gibco), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco), 0,1% de anfotericina B (Eurofarma) e 1% de metilcelulose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Após 6-7 dias de incubação em estufa de CO₂ as culturas celulares foram fixadas com formaldeído 5% e coradas com cristal violeta 0,25%. Posteriormente, em aumento de 40X, foram contadas as regiões de crescimento viral e o título expresso em unidades formadoras de placa por ml (UFP/ml). Foi então preparada uma solução antigênica contendo proporções iguais das duas cepas-padrão do VRS (10⁹ UFP/ml) e utilizada como antígeno viral nos ensaios imunoenzimáticos.

3.4 Detecção e avidéz de anticorpos IgG anti-VRS

Cento e setenta amostras séricas (104 casos e 66 controles) foram submetidas a reações imunoenzimáticas do tipo ELISA indireta e ELISA avidéz com o objetivo de detectar e mensurar a avidéz de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG3 anti-VRS. As reações foram

realizadas conforme descrito previamente por Queiróz, et al. (2002), com pequenas modificações.

3.4.1 ELISA indireta e ELISA avidéz para IgG total anti-VRS

Placas de microtitulação de alta afinidade (Corning Incorporated Costar, Nova York, NY, USA) foram sensibilizadas com 50µl/poço do antígeno viral ou antígeno controle diluídos 1/20 em salina tamponada com fosfatos 0,01M (PBS, pH 7,2) e incubadas por 18 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Em seguida, adicionou-se 50µl/poço dos soros teste, em duplicata, na diluição de 1/100 em PBS-T acrescido de 5% leite em pó Molico[®] (PBS-T-M), e foram incubados por duas horas a 37°C. A seguir, as placas foram novamente lavadas seis vezes com PBS-T. Posteriormente, foi adicionado o conjugado anti-IgG humana-peroxidase (Sigma Chemical Co.) na diluição de 1/2000 em PBS-T-M, e a placa foi novamente incubada por uma hora a 37°C. Após nova lavagem, foram adicionados 50µl/poço de substrato enzimático [0,03% H₂O₂ e 0,01M 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazol-6-ácido sulfônico (ABTS - Sigma Chemical Co.) em tampão citrato fosfato (0,07M e pH 4,2)].

Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em comprimento de onda de 405nm em leitora de placas (Titertek Multiskan Plus spectrophotometer; Flow Laboratories, McLean, VA, USA). Para cada amostra três valores de DO foram calculados: DO_{VRS} – a média dos valores das DO obtidos para as amostras de soro em duplicata com o antígeno viral; DO_C – a média dos valores de DO obtidos para essas mesmas amostras, porém com o antígeno controle; e DO_L a diferença entre a DO_{VRS} e a DO_C. O valor do limiar de reatividade (*cutoff*) foi calculado como a média da DO_L de três controles negativos acrescido de três desvios padrão (DPs). Os níveis de anticorpos foram arbitrariamente expressos como índice ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: $IE = DO_L / cutoff$ e, amostras com valores de IE >1,2 foram consideradas positivas (SILVA et al., 2002).

Nos ensaios de ELISA a avidez para anticorpos IgG total anti-VRS, a reação foi semelhante ao ELISA indireto descrito anteriormente, exceto que as amostras de soro foram submetidas a diluições duplas seriadas (de 1:250 a 1:8000) e adicionadas às placas em quadruplicata. Também, na primeira etapa de lavagem após a adição dos soros-teste, uma das duplicatas foi lavada por 10 minutos com PBS-T acrescido de uréia 7M (PBS-T-U) enquanto a outra duplicata foi lavada apenas com PBS-T e, em seguida, todos os poços passaram por três ciclos de lavagem com PBS-T. Os resultados da avidez foram expressos em índice avidez (IA) e para minimizar possíveis diferenças na avidez, em dependência da concentração de anticorpos, o IA de cada amostra foi calculado de acordo com o descrito por Wiuff et al. (2002), com algumas modificações. Primeiramente foi calculado IA para as diferentes diluições de cada amostra de acordo com a fórmula $IA (\%) = (DO_{U+} / DO_{U-}) \times 100$, onde DO_{U+} representa a DO_L obtida dos poços tratados com uréia, enquanto a DO_{U-} foi obtida a partir dos poços tratados sem uréia (DO_{U-}). Em seguida, a avidez final de cada amostra foi determinada como a média de dois ou mais IAs, obtidos de diferentes diluições positivas ($IE > 1,2$).

A avidez dos anticorpos anti-VRS foi analisada de acordo com valores predeterminados arbitrariamente, definidos como baixa avidez (<50,0%), avidez intermediária (50,0-70,0%) e alta avidez ($\geq 70,0\%$) e três diferentes grupos de idade foram considerados de acordo com o perfil dos níveis de anticorpos que apresentaram: <3 meses, 3-24 meses e ≥ 24 meses.

3.4.2 ELISA indireta e ELISA avidez para IgG1 e IgG3 anti-VRS

As reações foram realizadas como descritas anteriormente com as seguintes modificações: as amostras de soro foram diluídas a 1:50 (IgG1) ou 1:25 (IgG3) em PBS-T-M (1%); após lavagem as placas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-IgG1 ou anti-IgG3 humana (Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:1.000 por 1h a 37°C e, em seguida, com estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:1.000 por 30

minutos à temperatura ambiente. Para os ensaios de ELISA a videz de IgG1 e IgG3 anti-VRS, as amostras de soro foram submetidas a diluições duplas seriadas, de 1:25 ou 1:50 até 1:800.

3.5 Análise estatística

Para análise estatística, foi utilizado o software GraphPad Prism, v. 4.0, (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Como as amostras não apresentaram distribuição normal (Gaussiana) após análise pelo teste de normalidade de Kolmorov-Smirnov, testes não-paramétricos foram utilizados. Os níveis de anticorpos foram comparados entre os grupos de estudo utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Para comparação de proporções foi usado o teste exato de Fisher. Diferenças apresentando valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

Cento e setenta amostras séricas foram incluídas no presente estudo, sendo 104 provenientes de pacientes com DRA causada pelo VRS (casos) e 66 de crianças sem DRA (controles). As características clínicas e demográficas da população de estudo estão descritas na Tabela I. Dentre os casos, 70,2% (73/104) apresentaram DTRI, sendo bronquiolite o diagnóstico mais freqüente (63%), seguido por bronquite (16,4%) e pneumonia (13,7%). Mais de 70% (75/104) dessas crianças eram <12 meses de idade, sendo que um alto índice de hospitalização (78,3% - 47/60) foi descrito para as crianças <6 meses. Não foram encontradas diferenças estatísticas em relação ao gênero.

Tabela I – Características demográficas e clínicas de casos e controles testados para a presença de IgG anti-VRS atendidos no Hospital de Clínicas de Uberlândia, MG, entre 2000 e 2009

Grupo etário (meses)	Casos							Controles		
	N	Idade ^a	M/F	Hosp. (%)	Não Hosp. (%)	DTRI (%)	DTRS (%)	N	Idade ^a	M/F
<1	8	18 ^b	4/4	8 (100,0)	0 (0,0)	5 (62,5)	3 (37,5)	16	1 ^b	9/7
1-3	35	1	18/17	29 (82,8)	6 (17,2)	29 (82,8)	6 (17,2)	3	2	1/2
3-6	17	4	11/6	10 (58,8)	7 (41,2)	13 (76,4)	4 (23,6)	9	4	3/6
6-9	10	7	6/4	4 (40,0)	6 (60,0)	7 (70,0)	3 (30,0)	4	8	3/1
9-12	5	9	1/4	3 (60,0)	2 (40,0)	4 (80,0)	1 (20,0)	5	11	3/2
12-24	19	14	11/8	5 (26,3)	14 (73,7)	9 (47,4)	10 (52,6)	14	18	6/8
≥24	10	38	4/6	3 (30,0)	7 (70,0)	6 (60,0)	4 (40,0)	15	45	5/10
Total	104	4	55/49	62 (59,6)	42 (40,4)	73 (70,2)	31 (29,8)	66	14	30/36

N: número de amostras; ^a: idade mediana em meses; ^b: idade mediana em dias; M: masculino; F: feminino; Hosp.: hospitalizados; DTRI: doença do trato respiratório inferior; DTRS: doença do trato respiratório superior

Análises das amostras de soro testadas por meio de ELISA indireta demonstraram uma ocorrência de IgG total anti-VRS em aproximadamente 73,0% (124/170) dos espécimes estudados (Tabela II). Entre as crianças <3 meses, foi detectada alta ocorrência (>97%) desses anticorpos em ambos os grupos e em altos níveis (IE mediana = 7,8) (Figura 1). Entretanto, tanto a ocorrência quanto os níveis de IgG total anti-VRS apresentaram uma queda de acordo com o aumento da idade da criança – entre 3 e 24 meses. Dos 24 meses em diante, novamente

observou-se alta ocorrência e altos níveis deste biomarcador, com valores similares aos encontrados em crianças <3 meses (Figura 1).

Para ambos os grupos, a IgG1 anti-VRS foi a subclasse mais comumente encontrada, com uma frequência de cerca de 66,0% (112/170), enquanto que a IgG3 foi detectada em apenas 5,3% (9/170). Entre os diferentes grupos etários, a IgG1 apresentou padrão similar ao descrito para a IgG total, com alta ocorrência e altos níveis nas idades extremas e uma janela sorológica dos 3 aos 24 meses (Figura 1). Os anticorpos IgG3 anti-VRS foram pouco detectados na maioria dos grupos etários, exceto nos pacientes com DRA ≥ 24 meses (Tabela II), nos quais três das 10 amostras apresentaram altos níveis dessa subclasse, com valores de IE variando entre 6,6 e 15,7 (Figura 1).

Tabela II – Ocorrência de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG3 anti-VRS em amostras de soro de casos e controles atendidos no Hospital de Clínicas de Uberlândia, MG, entre 2000 e 2009

Grupo etário (meses)	Casos				Controles			
	N	IgG total (%)	IgG1 (%)	IgG3 (%)	N	IgG total (%)	IgG1 (%)	IgG3 (%)
<1	8	8 (100,0)	8 (100,0)	0 (0,0)	16	16 (100,0)	16 (100,0)	0 (0,0)
1-3	35	34 (97,1)	33 (94,3)	0 (0,0)	3	3 (100,0)	3 (100,0)	0 (0,0)
3-6	17	13 (76,5)	8 (47,1)	0 (0,0)	9	8 (88,9)	6 (66,7)	1 (11,1)
6-9	10	2 (20,0)	1 (10,0)	1 (10,0)	4	1 (25,0)	1 (25,0)	0 (0,0)
9-12	5	2 (40,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	5	2 (40,0)	2 (40,0)	1 (20,0)
12-24	19	6 (31,6)	5 (26,3)	1 (5,3)	14	6 (42,8)	6 (42,8)	2 (14,3)
≥ 24	10	8 (80,0)	7 (70,0)	3 (30,0)	15	15 (100,0)	15 (100,0)	0 (0,0)
Total	104	73 (70,2)	63(60,6)	5 (4,8)	66	51 (77,3)	49 (74,2)	4 (6,1)

N: número de amostras

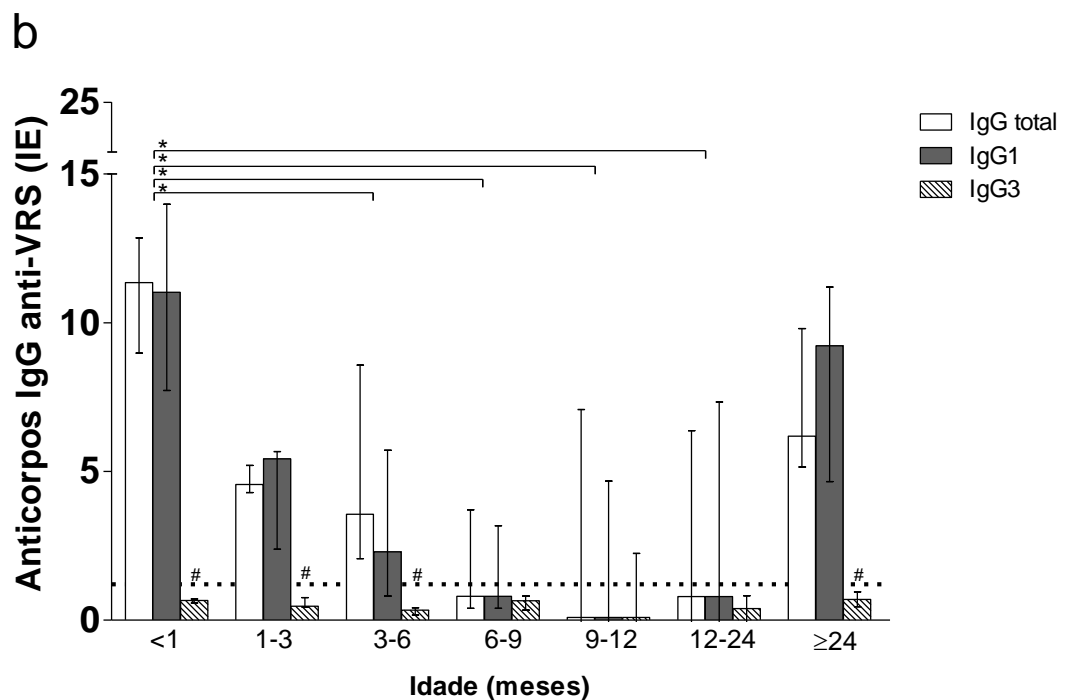
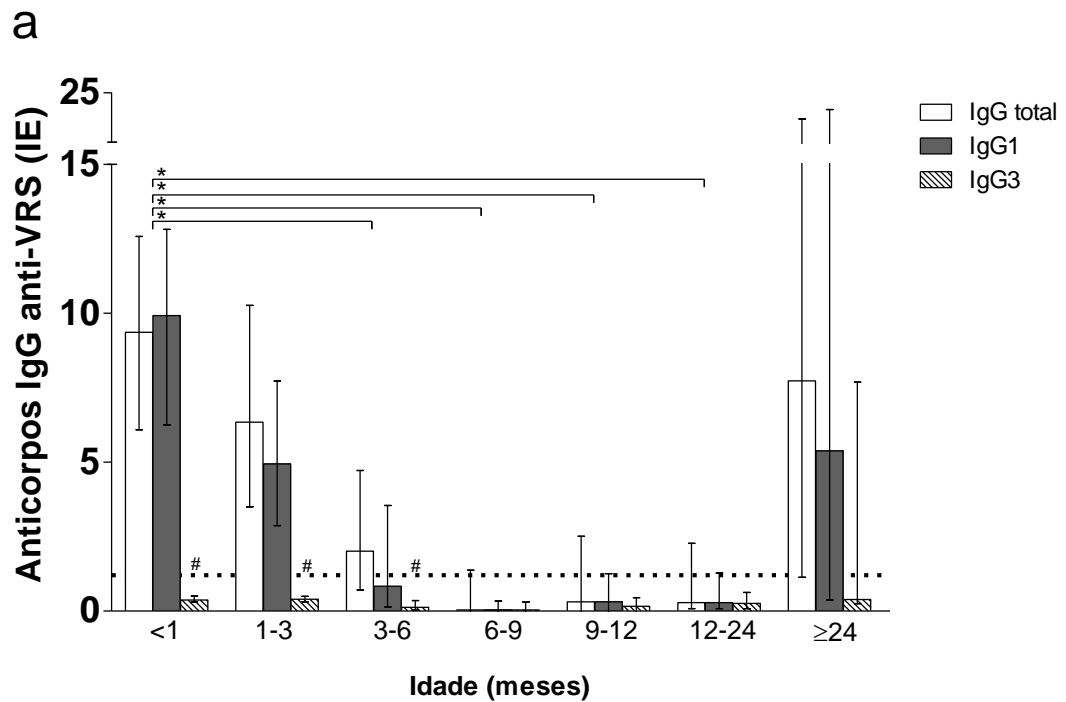


Figura 1 – Níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG3 anti-VRS mensurados por ELISA indireta e expressos em índice ELISA (IE) em amostras de soro de crianças com DRA causada pelo VRS (**a**, casos) e sem DRA (**b**, controles). As barras representam a mediana com a variação interquartil. A linha pontilhada indica o limiar de reatividade (*cutoff*, IE = 1,2). *Significância estatística dos níveis de IgG total e IgG1 anti-VRS em comparação com <1 mês de idade ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney). #Significância estatística entre os níveis de IgG total/IgG1 e IgG3 anti-VRS no mesmo grupo etário ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney).

Anticorpos IgG total anti-VRS de alta avidéz foram detectados em 42,1% (8/19) das amostras pertencentes ao grupo controle <3 meses em comparação com apenas 9,5% (4/42) do grupo casos com a mesma faixa etária ($p = 0,0055$) (Tabela III). Resultados similares foram encontrados para IgG1 de alta avidéz nesse mesmo grupo etário, sendo 42,1% (8/19) contra 4,9% (2/41) ($p = 0,0009$), respectivamente. Entretanto, apenas 10,5% (2/19) das amostras controle apresentaram IgG1 anti-VRS de baixa avidéz contra 51,2% (21/41) dos pacientes com DRA <3 meses ($p = 0,0037$). Tais observações foram enfatizadas quando calculada a avidéz mediana dos IA de IgG total e IgG1 anti-VRS, dos diferentes grupos etários e comparadas entre casos e controle (Figura 2). Foi observado que os controles <3 meses apresentavam uma maior avidéz mediana que os casos para os anticorpos IgG total ($p = 0,0089$) e IgG1 ($p = 0,0003$). Das nove amostras positivas para IgG3 anti-VRS, oito (89,0%) apresentaram baixa avidéz e apenas uma amostra apresentou avidéz intermediária. Em decorrência da baixa frequência de IgG3 anti-VRS entre as amostras estudadas, outras análises não foram realizadas.

Tabela III – Porcentagem de amostras de soro de casos e controles com diferentes graus de avidéz (baixa, intermediária e alta) obtidos em ensaios de ELISA avidéz para anticorpos IgG total e IgG1 anti-VRS em diferentes grupos etários

Grau de avidéz	Amostras de soro (%)					
	Casos			Controles		
	<3 meses	3-24 meses	≥24 meses	<3 meses	3-24 meses	≥24 meses
IgG total						
Baixa (<50,0%)	26,2	21,7	12,5	10,5	41,2	20,0
Intermediária (50,0-70,0%)	64,3	78,3	87,5	47,4	41,2	46,6
Alta (≥70,0%)	9,5*	0,0	0,0	42,1	17,6	33,4
IgG1						
Baixa (<50,0%)	51,2*	40,0	28,6	10,5	53,3	26,7
Intermediária (50,0-70,0%)	43,9	60,0	71,4	47,4	40,0	60,0
Alta (≥70,0%)	4,9*	0,0	0,0	42,1	6,7	13,3

*Significância estatística entre casos e controles para o mesmo grupo etário determinado pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

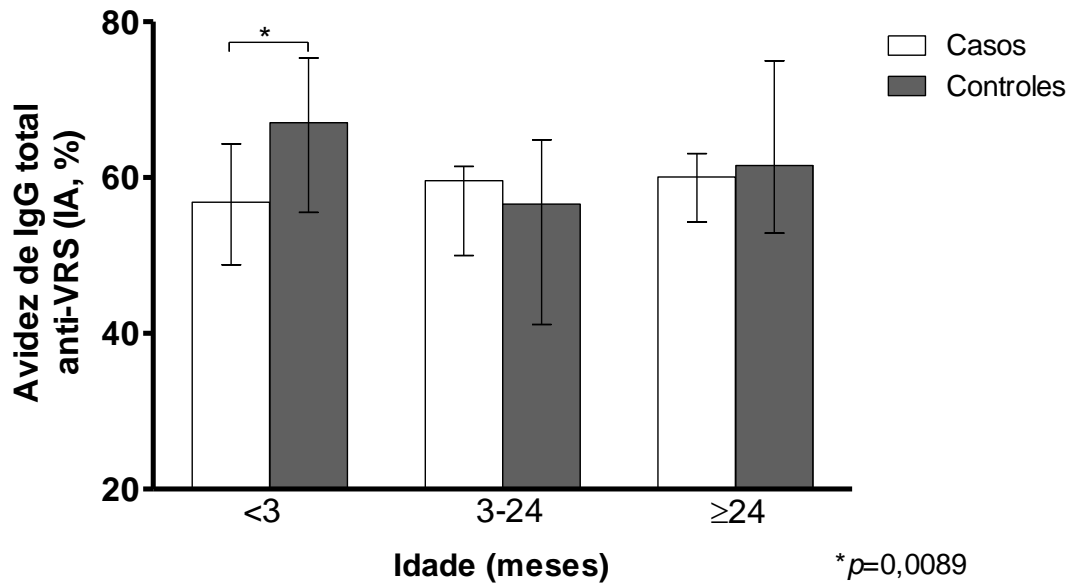
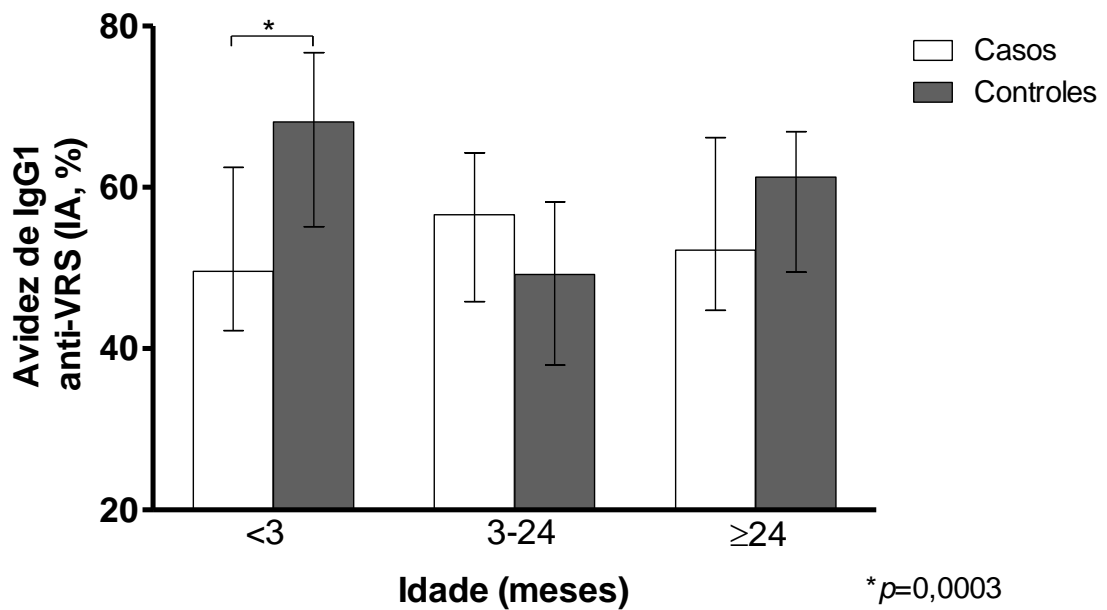
a**b**

Figura 2 – Comparação da avidéz mediana de anticópos IgG total (a) e IgG1 anti-VRS (b) mensurada por ELISA avidéz e expreso em índice avidéz (IA, %) entre amostras de soro de crianças com DRA causada pelo VRS (casos) e sem DRA (controles). As barras representam a mediana com a variação interquartil. *Significância estatística entre casos e controles ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney).

A avidéz dos anticorpos IgG anti-VRS também foi comparada entre as crianças do grupo caso, buscando uma possível associação com gravidade e incidência de hospitalização. No entanto, diferenças significantes foram encontradas apenas entre crianças da faixa etária ≥ 24 meses (Figura 3), nas quais aquelas com DTRI apresentaram menor avidéz de anticorpos IgG total (IA mediano = 55,7%) que crianças com DTRS (IA mediano = 63,7%) ($p = 0,0357$). Diferenças significantes entre crianças hospitalizadas e não hospitalizadas não foram observadas.

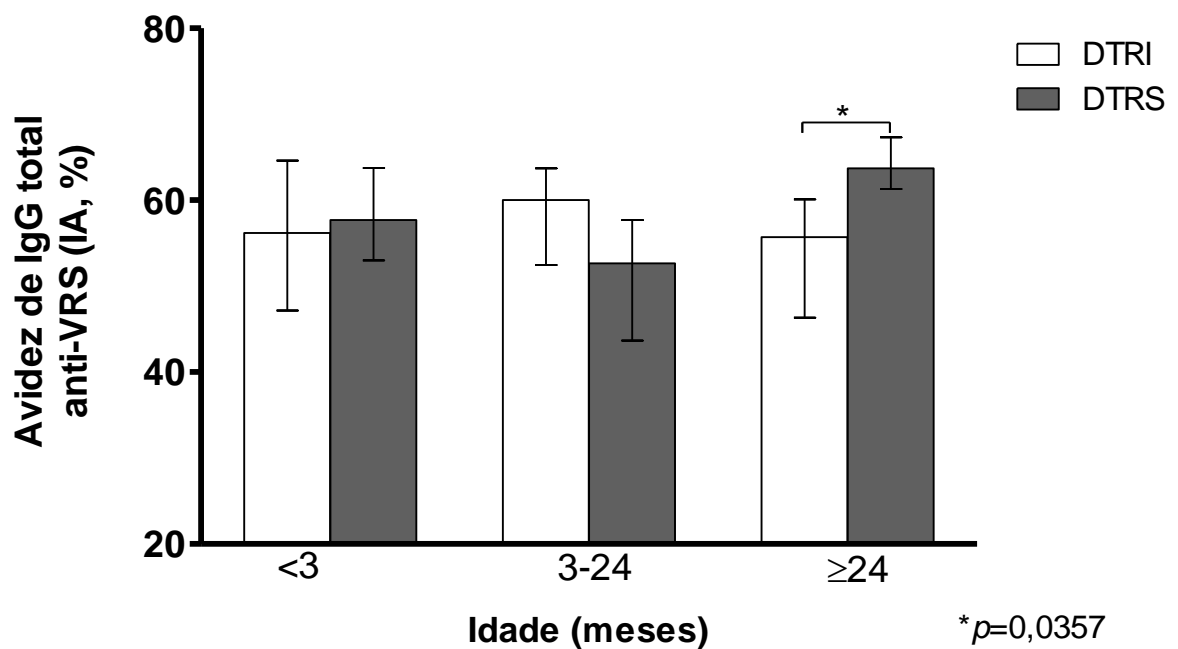


Figura 3 – Comparação da avidéz de anticorpos IgG total anti-VRS mensurada por ELISA e expresso em índice avidéz (IA, %) entre amostras de soro de crianças com DTRI e com DTRS. As barras representam a mediana com a variação interquartil. *Significância estatística entre DTRI e DTRS ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados aspectos da resposta imune humoral em amostras de soro de crianças ≤ 5 anos de idade com DRA, causada pelo VRS, e crianças sem sintomas clínicos de DRA. A exemplo de estudos prévios, a maioria dos pacientes com infecção pelo VRS apresentava idade < 12 meses, fato este que reflete uma característica bem conhecida da infecção causada por esse vírus. O aparecimento de sinais clínicos está intimamente relacionado à idade da criança, sendo o VRS responsável por altas taxas de hospitalização entre os < 6 meses em decorrência principalmente do comprometimento do trato respiratório inferior (NOKES et al., 2008; BERGER et al., 2009). Di Carlo et al. (2009) observaram que a faixa etária de 0-6 meses é a que apresenta maior risco de hospitalização em decorrência da infecção por esse vírus.

A detecção de altos níveis de IgG anti-VRS nas amostras sanguíneas das crianças < 3 meses aqui estudadas, reflete uma transferência materno-fetal de anticorpos (QUEIRÓZ et al., 2002; SHINOFF et al., 2008; STENSBALLE et al., 2009a), que ocorre principalmente através da placenta durante a vida intra-uterina (WONG e OGRA, 1986). Alguns estudos têm demonstrado que anticorpos maternos específicos contra o VRS com capacidade neutralizante protegem crianças de tenra idade contra hospitalização em decorrência da infecção por esse vírus (STENSBALLE et al., 2009a). Por outro lado, esses anticorpos foram associados a efeitos inibitórios no desenvolvimento da resposta imune ativa da criança, sendo apontados como um dos principais obstáculos na indução de uma resposta imune eficiente em crianças precocemente imunizadas (CROWE, 2001). Shinoff et al. (2008) demonstraram que o nível de anticorpos neutralizantes preexistentes no momento da infecção está diretamente ligado a formação da resposta anti-VRS, sendo que baixos níveis desses anticorpos possibilitariam o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva mesmo em crianças de tenra idade.

A diminuição na taxa de IgG anti-VRS, aqui observada, na faixa etária de neonatos até por volta dos seis meses de idade pode ser atribuída à meia-vida dos anticorpos maternos adquiridos passivamente – tornando esses indivíduos ainda mais susceptíveis à infecção pelo VRS (HAMILTON, 1987). Por outro lado, a baixa detecção desses anticorpos dos seis aos 24 meses pode ser reflexo de uma inabilidade de gerar resposta rápida com níveis detectáveis de IgG específica ao VRS, durante a fase aguda da primoinfecção. Queiróz et al. (2002) observaram altas taxas de soroconversão entre as fases aguda e convalescente da doença, em crianças >6 meses de idade. Outro aspecto a ser considerado e comentado por esses mesmos autores é a dificuldade de esse vírus em induzir memória imunológica, pelo menos numa primoinfecção. Entretanto, uma das limitações de nosso estudo foi não ter disponível amostras da fase convalescente da infecção.

A resposta imune contra esse vírus é tida como não duradoura e reinfeções são comuns em crianças ≥ 24 meses (WAGNER et al., 1989; NOKES et al., 2008) – a mesma faixa etária na qual um expressivo aumento nos níveis de anticorpos anti-VRS foi notado neste estudo. Wagner et al. (1989) demonstraram que a produção de anticorpos do tipo IgG por crianças atinge seu nível máximo após a segunda infecção pelo VRS, e tais níveis são similares aos observados previamente em adultos infectados experimentalmente (WAGNER et al., 1987).

Sabe-se que em resposta às infecções virais, a produção de anticorpos IgG1 e IgG3 específicos é mais vantajosa para a eliminação viral, uma vez que essas subclasses de IgG promovem opsonização, atividade neutralizante e/ou ativação do complemento (HAMILTON, 1987). Em concordância com outras investigações (HORNSLETH et al., 1985; QUEIRÓZ et al., 2002) a subclasse de IgG anti-VRS mais comumente identificada em nosso estudo foi IgG1, a qual demonstrou um perfil similar a IgG total, enquanto que IgG3 foi detectada em apenas 5,3% das amostras de soro analisadas. Apesar de IgG1 e IgG3 serem as principais subclasses transferidas através da placenta, aproximadamente 60-70% dos anticorpos IgG

total presentes no soro de adultos saudáveis são do tipo IgG1, enquanto que IgG3 corresponde a apenas 5-8% (HAMILTON, 1987). Outra interessante observação em relação à subclasse IgG3 encontrada no presente trabalho, foi a incidência de altos níveis dessa subclasse nas amostras de três dos 10 casos ≥ 24 meses, enquanto que a incidência total de IgG3 não passou de 5,3% (9/170). Apesar do pequeno número de amostras com alto nível de IgG3, talvez possa ser especulado que esses três casos poderiam representar reinfecções.

Neste estudo, a avidéz não foi dependente da idade, ao contrário da ocorrência e dos níveis de anticorpos IgG anti-VRS. O fato do índice de avidéz dos casos < 3 meses de idade ter sido significativamente menor que o dos controles, sugere que a susceptibilidade ou a proteção contra a doença esteja relacionada à menor ou à maior avidéz de anticorpos IgG específicos ao VRS, respectivamente. Outros estudos têm demonstrado a importância dos anticorpos maternos em resposta às infecções pelo VRS, onde anticorpos com capacidade neutralizante protegem contra a hospitalização (PIEDRA et al., 2003; STENSBALLE et al., 2009a; STENSBALLE et al., 2009b). Neste contexto, já foi evidenciado que diferenças na avidéz de anticorpos anti-VRS podem interferir na capacidade neutralizante dos anticorpos específicos (WU et al., 2007; DELGADO et al., 2009).

Por meio de estudos experimentais com modelos animais, Delgado et al. (2009) demonstraram que o processo de maturação por afinidade de anticorpos anti-VRS induz uma resposta eficiente frente à vacinação. Esses autores atribuíram a resposta não protetora induzida após imunização com FIRSV e ultimamente relacionada à exacerbação da doença respiratória causada pelo VRS, à produção de anticorpos de baixa avidéz. Neste estudo, o achado de índices de avidéz de IgG anti-VRS significativamente mais elevados nos casos ≥ 24 meses de idade com DTRS, poderia ressaltar a capacidade protetora dos anticorpos IgG específicos ao VRS, uma vez que, anticorpos de menor avidéz foram observados para os casos com DTRI. Também para o vírus do sarampo, outro membro da família

Paramyxoviridae, a resposta baseada em anticorpos de baixa avidéz está relacionada ao desenvolvimento de doença atípica, com manifestações clínicas graves após a exposição ao vírus selvagem (POLACK et al., 1999; POLACK et al., 2003).

Para finalizar, apesar de o ensaio de avidéz de IgG anti-VRS apresentar pouco valor diagnóstico para a infecção, este estudo sugere que a avidéz de anticorpos específicos ao VRS, tanto pode estar relacionada à proteção em crianças menores de três meses de idade, quanto pode estar relacionada com o desenvolvimento de doença grave nas ≥ 24 meses. Até onde se sabe, esta é a primeira pesquisa que buscou uma possível correlação entre a avidéz de anticorpos IgG anti-VRS e a gravidade da doença decorrente da infecção por esses vírus em amostras de crianças com DRA. Talvez essa correlação possa ser melhor esclarecida em pesquisas futuras a partir de amostras de soro pareadas das fases aguda e convalescente, investigando concomitantemente a capacidade neutralizante dos anticorpos IgG anti-VRS.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que, tanto a ocorrência como os níveis de anticorpos IgG anti-VRS foram idade dependentes, com altas taxas de anticorpos maternos nas crianças <3 meses de idade e alta produção de anticorpos próprios nas ≥ 24 meses.

A avidéz de anticorpos IgG anti-VRS pode estar associada a maior proteção em crianças <3 meses de idade, devido à presença de anticorpos maternos de alta avidéz, e por outro lado, à doença mais grave em crianças ≥ 2 anos - com anticorpos de baixa avidéz.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K. **B Cell Activation and Antibody Production**. In Cellular and Molecular Immunology. ABBAS; LICHTMAN e PILLAI. Philadelphia, PA, SAUNDERS ELSIVIER, 2007.
- ANDERSON, L. J.; HIERHOLZER, J. C.; TSOU, C.; HENDRY, R. M.; FERNIE, B. F.; STONE, Y. e MCINTOSH, K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **J Infect Dis** 151(4): 626-633, 1985.
- ARBIZA, J.; DELFRARO, A. e FRABASILE, S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 100(3): 221-230, 2005.
- BÉLA, S. R.; OLIVEIRA SILVA, D. A.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; PIROVANI, C. P.; CHAVES-BORGES, F. A.; REIS DE CARVALHO, F.; CARRIJO DE OLIVEIRA, T. e MINEO, J. R. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. **Diagn Microbiol Infect Dis** 62(3): 245-254, 2008.
- BERGER, T. M.; AEBI, C.; DUPPENTHALER, A. e STOCKER, M. Prospective population-based study of RSV-related intermediate care and intensive care unit admissions in Switzerland over a 4-year period (2001-2005). **Infection** 37(2): 109-116, 2009.
- BLOUNT, R. E., JR.; MORRIS, J. A. e SAVAGE, R. E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proc Soc Exp Biol Med** 92(3): 544-549, 1956.
- BUENO, S. M.; GONZALEZ, P. A.; PACHECO, R.; LEIVA, E. D.; CAUTIVO, K. M.; TOBAR, H. E.; MORA, J. E.; PRADO, C. E.; ZUNIGA, J. P.; JIMENEZ, J.; RIEDEL, C. A. e KALERGIS, A. M. Host immunity during RSV pathogenesis. **Int Immunopharmacol** 8(10): 1320-1329, 2008.
- CANE, P. A. e PRINGLE, C. R. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. **J Virol** 69(5): 2918-2925, 1995.

- CHANOCK, R.; ROIZMAN, B. e MYERS, R. 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, 1957.
- CHIN, J.; MAGOFFIN, R. L.; SHEARER, L. A.; SCHIEBLE, J. H. e LENNETTE, E. H. Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. **Am J Epidemiol** 89(4): 449-463, 1969.
- COLLINS, W. B. e CHANOCK, R. **Respiratory syncytial virus**. In Virology. FIELDS, B. N. Philadelphia, PA, LIPPINCOTT-RAVEN, 2007.
- COSTA, L. F.; YOKOSAWA, J.; MANTESE, O. C.; OLIVEIRA, T. F.; SILVEIRA, H. L.; NEPOMUCENO, L. L.; MOREIRA, L. S.; DYONISIO, G.; ROSSI, L. M.; OLIVEIRA, R. C.; RIBEIRO, L. Z. e QUEIROZ, D. A. 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, 2006.
- CROWE, J. E., JR. Respiratory syncytial virus vaccine development. **Vaccine** 20 Suppl 1: S32-37, 2001.
- DE SOUZA, V. A.; FERNANDES, S.; ARAUJO, E. S.; TATENO, A. F.; OLIVEIRA, O. M.; OLIVEIRA, R. R. e PANNUTI, C. S. Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections. **J Clin Microbiol** 42(4): 1782-1784, 2004.
- DELGADO, M. F.; COVIELLO, S.; MONSALVO, A. C.; MELENDI, G. A.; HERNANDEZ, J. Z.; BATALLE, J. P.; DIAZ, L.; TRENTO, A.; CHANG, H. Y.; MITZNER, W.; RAVETCH, J.; MELERO, J. A.; IRUSTA, P. M. e POLACK, F. P. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. **Nat Med** 15(1): 34-41, 2009.
- DI CARLO, P.; ROMANO, A.; SALSA, L.; GUELI, A.; POMA, A.; FUCA, F.; DONES, P.; COLLURA, M.; PAMPINELLA, D.; MOTISI, D. e CORSELLO, G. Epidemiological assessment of Respiratory Syncytial Virus infection in hospitalized infants, during the season 2005-2006 in Palermo, Italy. **Riv Ital Pediatr** 35(1): 11, 2009.

- ENDERS, G. e KNOTEK, F. Rubella IgG total antibody avidity and IgG subclass-specific antibody avidity assay and their role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. **Infection** 17(4): 218-226, 1989.
- FERNALD, G. W.; ALMOND, J. R. e HENDERSON, F. W. Cellular and humoral immunity in recurrent respiratory syncytial virus infections. **Pediatr Res** 17(9): 753-758, 1983.
- FLEMING, D. M.; ELLIOT, A. J. e CROSS, K. W. Morbidity profiles of patients consulting during influenza and respiratory syncytial virus active periods. **Epidemiol Infect** 135(7): 1099-1108, 2007.
- FLEMING, D. M.; PANNELL, R. S. e CROSS, K. W. Mortality in children from influenza and respiratory syncytial virus. **J Epidemiol Community Health** 59(7): 586-590, 2005.
- GLEZEN, P. e DENNY, F. W. Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. **N Engl J Med** 288(10): 498-505, 1973.
- GLEZEN, W. P.; TABER, L. H.; FRANK, A. L. e KASEL, J. A. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. **Am J Dis Child** 140(6): 543-546, 1986.
- GRAHAM, B. S.; JOHNSON, T. R. e PEEBLES, R. S. Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. **Immunopharmacology** 48(3): 237-247, 2000.
- HAMILTON, R. G. Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. **Clin Chem** 33(10): 1707-1725, 1987.
- HENDERSON, F. W.; COLLIER, A. M.; CLYDE, W. A., JR. e DENNY, F. W. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. **N Engl J Med** 300(10): 530-534, 1979.
- HORNSLETH, A.; BECH-THOMSEN, N. e FRIIS, B. Detection by ELISA of IgG-subclass-specific antibodies in primary respiratory syncytial (RS) virus infections. **J Med Virol** 16(4): 321-328, 1985.

- INOUE, S.; HASEGAWA, A.; MATSUNO, S. e KATOW, S. Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. **J Clin Microbiol** 20(3): 525-529, 1984.
- KAPIKIAN, A. Z.; MITCHELL, R. H.; CHANOCK, R. M.; SHVEDOFF, R. A. e STEWART, C. E. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. **Am J Epidemiol** 89(4): 405-421, 1969.
- KARRON, R. A.; WRIGHT, P. F.; BELSHE, R. B.; THUMAR, B.; CASEY, R.; NEWMAN, F.; POLACK, F. P.; RANDOLPH, V. B.; DEATLY, A.; HACKELL, J.; GRUBER, W.; MURPHY, B. R. e COLLINS, P. L. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. **J Infect Dis** 191(7): 1093-1104, 2005.
- KIM, H. W.; CANCHOLA, J. G.; BRANDT, C. D.; PYLES, G.; CHANOCK, R. M.; JENSEN, K. e PARROTT, R. H. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. **Am J Epidemiol** 89(4): 422-434, 1969.
- LEHTONEN, O. P. e VILJANEN, M. K. A binding function for curve-fitting in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its use in estimating the amounts of total and high affinity antibodies. **Int J Biomed Comput** 13(6): 471-479, 1982.
- MANHANI, M. N.; DA SILVA RIBEIRO, V.; OLIVEIRA SILVA, D. A. e COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgG avidity in active and inactive human neurocysticercosis. **Diagn Microbiol Infect Dis** 65(2): 211-213, 2009.
- MELERO, J. A. **Molecular biology of human respiratory syncytial virus**. In Respiratory syncytial virus. CANE, P.; ZUCKERMAN, A. J. e MUSHAHWAR, I. K. Philadelphia, PA, SAUNDERS ELSIVIER, 2007
- MEURMAN, O.; RUUSKANEN, O.; SARKKINEN, H.; HANNINEN, P. e HALONEN, P. Immunoglobulin class-specific antibody response in respiratory syncytial virus infection measured by enzyme immunoassay. **J Med Virol** 14(1): 67-72, 1984.

- MEURMAN, O.; WARIS, M. e HEDMAN, K. Immunoglobulin G antibody avidity in patients with respiratory syncytial virus infection. **J Clin Microbiol** 30(6): 1479-1484, 1992.
- MOGHADDAM, A.; OLSZEWSKA, W.; WANG, B.; TREGONING, J. S.; HELSON, R.; SATTENTAU, Q. J. e OPENSHAW, P. J. A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines. **Nat Med** 12(8): 905-907, 2006.
- MURPHY, B. R. e WALSH, E. E. Formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine induces antibodies to the fusion glycoprotein that are deficient in fusion-inhibiting activity. **J Clin Microbiol** 26(8): 1595-1597, 1988.
- NOKES, D. J.; OKIRO, E. A.; NGAMA, M.; OCHOLA, R.; WHITE, L. J.; SCOTT, P. D.; ENGLISH, M.; CANE, P. A. e MEDLEY, G. F. Respiratory syncytial virus infection and disease in infants and young children observed from birth in Kilifi District, Kenya. **Clin Infect Dis** 46(1): 50-57, 2008.
- OGRA, P. L. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. **Paediatr Respir Rev** 5 Suppl A: S119-126, 2004.
- OLIVEIRA, T. F.; FREITAS, G. R.; RIBEIRO, L. Z.; YOKOSAWA, J.; SIQUEIRA, M. M.; PORTES, S. A.; SILVEIRA, H. L.; CALEGARI, T.; COSTA, L. F.; MANTESE, O. C. e QUEIROZ, D. A. Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clinicas of Uberlandia, MG, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 103(5): 417-422, 2008.
- OPENSHAW, P. J. Potential therapeutic implications of new insights into respiratory syncytial virus disease. **Respir Res** 3 Suppl 1: S15-20, 2002.
- PANNUTI, C. S.; MORELLO, R. J.; MORAES, J. C.; CURTI, S. P.; AFONSO, A. M.; CAMARGO, M. C. e SOUZA, V. A. Identification of primary and secondary measles vaccine failures by measurement of immunoglobulin G avidity in measles cases during the 1997 Sao Paulo epidemic. **Clin Diagn Lab Immunol** 11(1): 119-122, 2004.

- PAPADOPOULOS, N. G.; GOURGIOTIS, D.; JAVADYAN, A.; BOSSIOS, A.; KALLERGI, K.; PSARRAS, S.; TSOLIA, M. N. e KAFETZIS, D. Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? **Respir Med** 98(9): 879-882, 2004.
- PAUNIO, M.; HEDMAN, K.; DAVIDKIN, I.; VALLE, M.; HEINONEN, O. P.; LEINIKKI, P.; SALMI, A. e PELTOLA, H. Secondary measles vaccine failures identified by measurement of IgG avidity: high occurrence among teenagers vaccinated at a young age. **Epidemiol Infect** 124(2): 263-271, 2000.
- PERET, T. C.; HALL, C. B.; HAMMOND, G. W.; PIEDRA, P. A.; STORCH, G. A.; SULLENDER, W. M.; TSOU, C. e ANDERSON, L. J. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. **J Infect Dis** 181(6): 1891-1896, 2000.
- PIEDRA, P. A.; JEWELL, A. M.; CRON, S. G.; ATMAR, R. L. e GLEZEN, W. P. Correlates of immunity to respiratory syncytial virus (RSV) associated-hospitalization: establishment of minimum protective threshold levels of serum neutralizing antibodies. **Vaccine** 21(24): 3479-3482, 2003.
- POLACK, F. P.; AUWAERTER, P. G.; LEE, S. H.; NOUSARI, H. C.; VALSAMAKIS, A.; LEIFERMAN, K. M.; DIWAN, A.; ADAMS, R. J. e GRIFFIN, D. E. Production of atypical measles in rhesus macaques: evidence for disease mediated by immune complex formation and eosinophils in the presence of fusion-inhibiting antibody. **Nat Med** 5(6): 629-634, 1999.
- POLACK, F. P.; HOFFMAN, S. J.; CRUJEIRAS, G. e GRIFFIN, D. E. A role for nonprotective complement-fixing antibodies with low avidity for measles virus in atypical measles. **Nat Med** 9(9): 1209-1213, 2003.
- PRINCE, G. A.; JENSON, A. B.; HEMMING, V. G.; MURPHY, B. R.; WALSH, E. E.; HORSWOOD, R. L. e CHANOCK, R. M. Enhancement of respiratory syncytial virus pulmonary pathology in cotton rats by prior intramuscular inoculation of formalin-inactivated virus. **J Virol** 57(3): 721-728, 1986.

- QUEIRÓZ, D. A.; DURIGON, E. L.; BOTOSSO, V. F.; EJZEMBERG, B.; VIEIRA, S. E.; MINEO, J. R.; YAMASHITA, C.; HEIN, N.; LOPES, C. L.; CACHARO, A. L. e STEWIEN, K. E. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. **Braz J Med Biol Res** 35(10): 1183-1193, 2002.
- SHINOFF, J. J.; O'BRIEN, K. L.; THUMAR, B.; SHAW, J. B.; REID, R.; HUA, W.; SANTOSHAM, M. e KARRON, R. A. Young infants can develop protective levels of neutralizing antibody after infection with respiratory syncytial virus. **J Infect Dis** 198(7): 1007-1015, 2008.
- SILVA, D. A.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W.; PAJUABA NETO, A. A.; FERRO, E. A. e MINEO, J. R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Vet Parasitol** 107(3): 181-195, 2002.
- STENSBALLE, L. G.; RAVN, H.; KRISTENSEN, K.; AGERSKOV, K.; MEAKINS, T.; AABY, P. e SIMOES, E. A. Respiratory syncytial virus neutralizing antibodies in cord blood, respiratory syncytial virus hospitalization, and recurrent wheeze. **J Allergy Clin Immunol** 123(2): 398-403, 2009a.
- STENSBALLE, L. G.; RAVN, H.; KRISTENSEN, K.; MEAKINS, T.; AABY, P. e SIMOES, E. A. Seasonal variation of maternally derived respiratory syncytial virus antibodies and association with infant hospitalizations for respiratory syncytial virus. **J Pediatr** 154(2): 296-298, 2009b.
- TANYUKSEL, M.; GUNEY, C.; ARAZ, E.; SARACLI, M. A. e DOGANCI, L. Performance of the immunoglobulin G avidity and enzyme immunoassay IgG/IgM screening tests for differentiation of the clinical spectrum of toxoplasmosis. **J Microbiol** 42(3): 211-215, 2004.
- TAYLOR, G. **Molecular biology of human respiratory syncytial virus**. In Respiratory syncytial virus. CANE, P.; ZUCKERMAN, A. J. e MUSHAHWAR, I. K. Philadelphia, PA, SAUNDERS ELSEVIER, 2007
- TREPANIER, P.; PAYMENT, P. e TRUDEL, M. A simple and rapid microassay for the titration of human respiratory syncytial virus. **J Virol Methods** 1(6): 343-347, 1980.

- UNDERWOOD, P. A. Measurement of the affinity of antiviral antibodies. **Adv Virus Res** 34: 283-309, 1988.
- WAGNER, D. K.; MUELENAER, P.; HENDERSON, F. W.; SNYDER, M. H.; REIMER, C. B.; WALSH, E. E.; ANDERSON, L. J.; NELSON, D. L. e MURPHY, B. R. Serum immunoglobulin G antibody subclass response to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins after first, second, and third infections. **J Clin Microbiol** 27(3): 589-592, 1989.
- WAGNER, D. K.; NELSON, D. L.; WALSH, E. E.; REIMER, C. B.; HENDERSON, F. W. e MURPHY, B. R. Differential immunoglobulin G subclass antibody titers to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins in adults. **J Clin Microbiol** 25(4): 748-750, 1987.
- WELLIVER, R. C. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. **J Pediatr** 143(5 Suppl): S112-117, 2003.
- WELLIVER, R. C.; KAUL, T. N.; PUTNAM, T. I.; SUN, M.; RIDDLESBERGER, K. e OGRA, P. L. The antibody response to primary and secondary infection with respiratory syncytial virus: kinetics of class-specific responses. **J Pediatr** 96(5): 808-813, 1980.
- WELLIVER, R. C., SR. The immune response to respiratory syncytial virus infection: friend or foe? **Clin Rev Allergy Immunol** 34(2): 163-173, 2008.
- WIUFF, C.; THORBERG, B. M.; ENGVALL, A. e LIND, P. Immunochemical analyses of serum antibodies from pig herds in a Salmonella non-endemic region. **Vet Microbiol** 85(1): 69-82, 2002.
- WONG, D. T. e OGRA, P. L. Neonatal respiratory syncytial virus infection: role of transplacentally and breast milk-acquired antibodies. **J Virol** 57(3): 1203-1206, 1986.
- WU, H.; PFARR, D. S.; JOHNSON, S.; BREWAH, Y. A.; WOODS, R. M.; PATEL, N. K.; WHITE, W. I.; YOUNG, J. F. e KIENER, P. A. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. **J Mol Biol** 368(3): 652-665, 2007.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Avidez de anticorpos IgG contra o vírus respiratório sincicial em crianças com doença respiratória aguda

Srs. Pais/Responsáveis,

O seu filho está sendo convidado para participar da pesquisa de avides de anticorpos contra o vírus respiratório sincicial em amostra de sangue obtida de crianças de 0-5 anos de idade com doença respiratória aguda, sob responsabilidade da professora pesquisadora Dra. Divina A. O. Queiróz e colaboração da Dra. Deise A. O. Silva, Guilherme R. O. Freitas, Tatiany Calegari, e Poliana C. Resende.

Os vírus respiratórios são os principais agentes causadores de doença respiratória aguda em crianças. Sendo assim, a detecção do agente que pode estar 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. Para isso, precisamos colher aproximadamente 1mL de secreção de nasofaringe, através da instilação de soro fisiológico na narina da criança e 2mL de sangue, por punção venosa.

Essas amostras serão coletadas pelas enfermeiras Tatiany ou Poliana, também responsáveis pela aplicação do T.C.L.E., utilizando equipamento estéril para não haver risco para a criança, e serão processadas no Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o diagnóstico viral, a ser realizado pela equipe acima referida.

As informações referentes ao seu filho serão confidenciais e os resultados da pesquisa serão publicados sem a identificação dele. A participação na pesquisa é voluntária, sem qualquer ônus ou benefício para a criança, podendo ser encerrada a qualquer momento.

Os benefícios serão relativos à descoberta do agente causador da doença, que auxiliará o médico no tratamento e também para a obtenção conhecimento científico.

Em caso de dúvida a respeito da pesquisa, entre em contato com qualquer um dos membros da equipe do Laboratório de Virologia acima referidos.

Instituto de Ciências Biomédicas – Laboratório de Virologia

Endereço: Av. Amazonas, Bloco 4C, andar superior; C. Umuarama; Uberlândia, MG

Fone: (034) 3218-2664

Uberlândia: ___/___/___

Nome do pai/mãe ou responsável

Assinatura

Enfermeira responsável pela coleta

Profa. Dra Divina Aparecida Oliveira Queiróz

Comitê de Ética em Pesquisa da UFU - (34) 3239-4531

ANEXO B

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= PaCO₂= PaO₂=

HCO₃= SatO₂= BE=

DIAGNÓSTICO NOSOLÓGICO: _____

Admissão: ____/____/____ Local: _____

Ventilação artificial: não sim (_____ dias)

ANEXO C



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: cep@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 384/08 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO
REGISTRO CEP/UFU 083/09

Projeto Pesquisa: Avidéz de anticorpos IgG contra o vírus respiratório sincicial em crianças com
doença respiratória aguda.

Pesquisador Responsável: Divina Aparecida Oliveira Queiroz

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

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites
da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os
Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação
pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a
Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega de relatório final: fevereiro de 2010.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER
INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA
MESMA.

Uberlândia, 3 de abril de 09

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

Orientações ao pesquisador

- 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 de o 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 aprobatório 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.

ANEXO D



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 (034) 239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 260/04

Registro CEP: 151/04

Projeto Pesquisa: *“Quantificação de lecitina ligante de monose em amostras de soro obtidas de crianças menores de 5 anos de idade com e sem infecção pelo vírus respiratório sincicial”.*

Pesquisador Responsável: Orlando César Mantese

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, 05 de novembro de 2004.


Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenador 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.

ANEXO E



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 (034) 239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 262/04

Registro CEP: 150/04

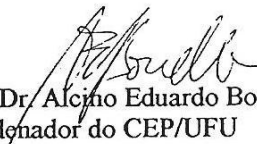
Projeto Pesquisa: *“Caracterização fenotípica de células mononucleadas de sangue periférico obtidas de crianças menores de 5 anos de idade com e sem infecção pelo vírus respiratório sincicial”.*

Pesquisador Responsável: Orlando César Mantese

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, 05 de novembro de 2004.


Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenador 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.