

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA
CAUSADA PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV) ATRAVÉS DA
METODOLOGIA MOLECULAR PCR**

FERNANDA CAROLINA PEDROSA

GUARAPUAVA

2015

FERNANDA CAROLINA PEDROSA

**INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA
CAUSADA PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV) ATRAVÉS DA
METODOLOGIA MOLECULAR PCR**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Avaliação Clínico Laboratorial de Processos Fisiopatológicos, da UNICENTRO em associação ampla com a UEPG.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Carraro

GUARAPUAVA

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e iluminar durante essa trajetória do mestrado, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em minhas necessidades.

Ao meu orientador professor Dr. Emerson Carraro por acreditar em mim e confiar a mim este trabalho, pela paciência, por todos os conhecimentos repassados nesse período, o meu eterno agradecimento.

Ao meu pai e minha mãe, Belchior e Cássia, os quais amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo em todos os momentos, nunca me deixando desanimar.

Ao meu irmão Gustavo pelo incentivo e por todos os momentos de risada e descontração depois dos estudos.

Aos meus amigos de laboratório, em especial a minha amiga Daniele Antonelo Campos, que esteve sempre ao meu lado nessa caminhada, me ajudando, dividindo tristezas e alegrias em todos os momentos.

A todos os colegas e professores da pós-graduação em ciências farmacêuticas da UNICENTRO pelo bom convívio e aprendizado durante esse período.

À fundação araucária pelo apoio financeiro.

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório (RSV) é considerado um dos principais agentes virais causadores de infecções graves do trato respiratório em lactentes e crianças no mundo todo e responsável por surtos anuais. A infecção por RSV resulta em vários sintomas, que vão desde gripais comuns até mais graves como a bronquiolite e pneumonia. A incidência anual global da infecção por RSV em crianças menores de 5 anos foi estimada em 34 milhões de casos por ano, com pelo menos 10% de episódios que representam infecções graves que necessitam de internação hospitalar. O objetivo desse trabalho foi investigar a ocorrência da infecção respiratória aguda causada pelo RSV em pacientes sintomáticos nos atendimentos de serviço de assistência primária a saúde pública na cidade de Guarapuava- Paraná. Assim, foram coletadas 144 amostras de secreção nasal, sendo os pacientes incluídos no estudo de todas as faixas etárias atendidos nos serviços da rede pública de saúde no município de Guarapuava- Paraná, entre o ano de 2013 e 2014. Nos resultados obtidos a idade média dos pacientes incluídos no estudo foi de 35,17 anos e a mediana de 31 anos, variando com o mínimo de 1 ano e o máximo de 82 anos de idade. Foram concluídas as análises de dados dos pacientes e padronizações da metodologia RT-PCR através de cepas controles de RSV no laboratório de Virologia e Biologia Molecular da UNICENTRO com êxito. A metodologia RT-PCR padronizada foi aplicada nas amostras, no entanto, não foram detectados casos de infecção respiratória por RSV em pacientes com sintomas respiratórios na cidade de Guarapuava- PR, o que prejudicou a descrição dos quadros clínicos, associação de fatores de risco e utilização de medicamentos nos casos infectados.

PALAVRAS-CHAVE: Diagnóstico, Vírus Sincicial Respiratório, Infecção Respiratória.

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is considered one of the main viral agents causing serious respiratory tract infections in infants and children worldwide, responsible for annual outbreaks. RSV infection results in various symptoms, since common influenza and even more severe as bronchiolitis and pneumonia. The global annual incidence of RSV infection in children under 5 years was estimated at 34 million cases per year, with at least 10% of events that represent serious infections requiring hospitalization. The aim of this study was to investigate the occurrence of acute respiratory infection caused by RSV in symptomatic patients in primary care service calls to public health in the city of Guarapuava- Paraná. Thus, 144 were collected samples of nasal secretion, being included in the study patients of all age groups, met in the public health services in the city of Guarapuava- Parana, between the year of 2013 and 2014. The results obtained the average age of patients included in the study was of 35,17 years and the median of 31 years, varying with the minimum of 1 year and a maximum of 82 years of age. The analysis of patient data and standardization of RT-PCR methodology through RSV controls strains in the laboratory of Virology and Molecular Biology UNICENTRO were completed successfully, for subsequent application of the technique in nasal secretion samples collected. The methodology RT-PCR standard was applied in the samples, however there aren't cases of respiratory infection by RSV in patients with respiratory symptoms in the city of Guarapuava-PR, which has damaged the description of clinical frame, association of risk factors and use of medicines on infected cases.

KEYWORDS: Diagnosis, Respiratory Syncytial Virus, Respiratory Infection.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA – Aminoácidos

BVA – Bronquiolite Viral Aguda

BV – Bronquiolite Viral

BOCA – Bocavírus

CCA – Agente da Coriza do Chimpanzé

cDNA – Ácido Desoxorribonucleico Complementar

CER – Células Epiteliais Respiratórias

COV – Coronavírus Humano

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar

dCTP – Desoxinucleotídeo de Citosina Trifosfato

dGTP – Desoxinucleotídeo de Guanidina Trifosfato

dATP – Desoxinucleotídeo de Adenina Trifosfato

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DNase – Desoxirribonuclease

DRA – Doença Respiratória Aguda

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

dTTP – Desoxinucleotídeos de Timina Trifosfato

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EIE – Ensaio Imunoenzimáticos

ELISA – Enzyme linked Immunosorbent Assay

HAdV – Adenovírus Humano

HRV – Rinovírus Humano

Hmpv – Metapneumovírus

IEM – Imuno Microscopia Eletrônica

IF – Imunofluorescência

IRA – Infecção Respiratória Aguda

ITRI – Infecção do Trato Respiratório Inferior

ITRS – Infecção do Trato Respiratório Superior

IVA – Infecção Viral Aguda

IVAS – Infecção das Vias Aéreas do Trato Superior

IVAI – Infecção das Vias Aéreas do Trato Inferior

KDa – Kilo Daltons

KCl – Cloreto de Potássio

MMLV - Moloney Murine Leukemia Vírus

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

mRNA – Ácido Ribonucléico Mensageiro

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-americana da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

Pb – Pares de Base

RNA – Ácido ribonucléico

RSV – Vírus Sincicial Respiratório

RT – Transcrição Reversa

RT-PCR – Transcrição Reversa seguido de Reação em Cadeia da Polimerase

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – Solução Tampão contendo Tris, ácido Bórico e EDTA

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VA – Vias Aéreas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do RSV.....	20
Figura 2 - Organização Genômica do Vírus Sincicial Respiratório.....	22
Figura 3 - Distribuição entre gênero feminino e gênero masculino dos pacientes incluídos no estudo com n= 144.....	41
Figura 4 - Distribuição dos pacientes incluídos no estudo por faixa etária.....	42
Figura 5 - Distribuição mensal das amostras incluídas no estudo.....	42
Figura 6 - Ocorrência de sintomas relatados pelos pacientes participantes do estudo.....	43
Figura 7 - Terapias Farmacológicas relatadas pelos pacientes incluídos no estudo.....	44
Figura 8 - Vacinação para os vírus da gripe H1N1, H3N2 e influenza B, nos pacientes incluídos no estudo.....	45
Figura 9 - Números de comorbidades relatada pelos pacientes incluídos no estudo.....	47
Figura 10 - Resultado da amplificação pela RT-PCR da cepa controle de RSV visualizado em gel de agarose a 1,2%.....	47
Figura 11 - Amplificação pela PCR das cepas controles diluídas de RSV.....	48
Figura 12 - Amplificação pela RT-PCR nas diferentes temperaturas de anelamento para cepas controles RSV na diluição de 10 ⁻²	49
Figura 13 - Amplificação pela RT-PCR testado frente a diferentes cepas controles de vírus.....	50
Figura 14 - Resultado da amplificação pela RT-PCR da cepa controle de RSV utilizando PCR SuperMix [®] , visualizado em gel de agarose a 1,2%.....	51
Figura 15 - Resultado da amplificação pela RT-PCR com diferentes volumes do reagente PCR SuperMix [®] em cepa controle de RSV visualizado em gel de agarose a 1,2%.....	52
Figura 16 - Amplificação da PCR utilizando o reagente PCR SuperMix [®] em cepas controles diluídas de RSV.....	52
Figura 17- Amplificação pela RT-PCR com PCR SuperMix [®] de reagentes nas diferentes temperaturas de anelamento para cepas controles RSV na diluição de 10 ⁻²	53

Figura 18- Amplificação pela RT-PCR para detecção de RSV em amostras respiratórias inclusas nesse estudo.....	54
Figura 19- Amplificação pela RT-PCR para detecção de RSV em amostras respiratórias inclusas nesse estudo.....	54
Figura 20- Amplificação pela RT-PCR para detecção de RSV em amostras respiratórias inclusas nesse estudo.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados na reação de Transcrição Reversa (RT).....	35
Tabela 2 - Reagentes utilizados na amplificação de RSV.....	37
Tabela 3 - Reagentes para amplificação de RSV utilizando um Mix de reagentes prontos PCR SuperMix®.....	38
Tabela 4 - Terapias Farmacológicas utilizadas pelos pacientes incluídos no estudo durante a infecção respiratória aguda.....	44
Tabela 5 – Pacientes vacinados e não vacinados inclusos no estudo, de acordo com a faixa etária.....	45
Tabela 6 - Relato da presença e ausência de comorbidades pelos pacientes incluídos no estudo.....	46

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1 Infecções respiratórias.....	13
1.2 Histórico do Vírus Sincicial Respiratório (RSV)	15
1.3 O Vírus Sincicial Respiratório.....	16
1.4 Transmissão.....	17
1.5 Patogênese.....	18
1.6 Aspectos estruturais do RSV.....	19
1.7 Epidemiologia do RSV.....	23
1.8 Sazonalidade.....	26
1.9 Diagnóstico laboratorial.....	26
1.9.1 Vacina e tratamento.....	29
2. OJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. METODOLOGIA.....	33
3.1 População e inclusão de casos.....	33
3.2 Amostras clínicas.....	34
3.3 Cepas controle.....	34
3.4 Extração do RNA viral.....	34
3.5 Reação de Transcrição Reversa (RT)	35
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR)	36
3.7 Reação em Cadeia da Polimerase utilizando o PCR SuperMix®.....	37
3.8 Eletroforese em gel de agarose.....	38
3.9 Otimização e padronização da RT-PCR.....	38
3.9.1 Limite de detecção.....	39
3.9.2 Variações na temperatura de anelamento.....	39
3.9.3 Variações na concentração do cloreto de magnésio.....	39
3.9.4 Variações na concentração da enzima <i>Taq</i> DNA Polimerase.....	39
3.9.5 Especificidade analítica dos primers.....	39

3.9.6 Metodologia RT-PCR aplicada nas amostras respiratórias incluídas no estudo.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1 Amostras.....	41
4.2 Sintomas.....	43
4.3 Tratamento.....	43
4.4 Vacina.....	45
4.5 Comorbidades.....	46
4.6 Padronização do ensaio de Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)	47
4.6.1 Limite de detecção.....	48
4.6.2 Temperatura de anelamento.....	48
4.6.3 Variações na concentração do Cloreto de Magnésio.....	49
4.6.4 Variações na concentração da enzima <i>Taq</i> DNA polimerase.....	49
4.6.5 Especificidade analítica dos primers.....	50
4.7 Padronização do ensaio utilizando reagente PCR SuperMix®	50
4.7.1 Padronização do ensaio de Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) com PCR SuperMix® em diferentes volumes.....	51
4.7.2 Limite de detecção.....	52
4.7.3 Temperatura de anelamento.....	53
4.8 Aplicação da metodologia RT-PCR para detecção de RSV nas amostras clínicas	53
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS.....	67
8. ANEXOS.....	81

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS

As infecções respiratórias agudas (IRAs) fazem parte de um grupo relevante de doenças humanas, que podem atingir pessoas de diferentes idades, sendo estas saudáveis ou não, independente de seu nível sócio-econômico. A preocupação com as doenças infecciosas respiratórias agudas intensificou-se no final da década de 70, quando os técnicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) analisaram dados epidemiológicos de vários países e estimaram que as IRAs eram responsáveis pela morte de uma criança a cada 20 segundos no mundo. Sendo que as pneumonias eram as maiores causas de óbitos e nos países em desenvolvimento ocorriam em elevada porcentagem (NUNES, 2004).

Globalmente, as infecções respiratórias agudas são a principal causa de morbidade e mortalidade entre crianças com menos de cinco anos de idade em todo o mundo (ALONSO et al., 2012). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, em 2002, as IRAs foram responsáveis por cerca de 3,96 milhões de mortes causadas em de crianças. Dois terços dessas mortes ocorrem em crianças menores de um ano de idade e 90% destas nos países em desenvolvimento (PECCHINI et al., 2008). Em termos de distribuição geográfica, 70% das crianças que morreram de IRA estão na África e no Sudeste Asiático (HUANG et al., 2013).

As IRAs podem ser classificadas quanto aos seus aspectos anatomoclínicos, tanto em infecções das vias aéreas do trato inferior (IVAI) como em infecções das vias aéreas do trato superior (IVAS) (NUNES, 2004). Sabe-se que 10% de todas as infecções respiratórias agudas nesta faixa etária afetam as vias aéreas do trato inferior. A evolução clínica e apresentação desses pacientes variam, porém em casos mais graves, como na insuficiência respiratória, eles estão relacionados com a bronquiolite e pneumonia (RICCETTO et al., 2009).

De modo geral, as infecções respiratórias virais agudas são as doenças mais comuns em crianças, sendo responsáveis por um elevado índice de atendimento médico pediátrico ambulatorial e hospitalar no mundo todo

(LOURENÇÃO et al., 2005). Segundo os dados da Organização Pan-americana da Saúde (OPAS) e da Organização Mundial de Saúde (OMS) referentes à prevalência e à incidência de infecções respiratórias agudas na América Latina, demonstra-se que essas infecções são responsáveis por cerca de 40 a 60% de todos os atendimentos ambulatoriais em pediatria. Além disso, essas doenças geram elevados custos diretos e indiretos com assistência à saúde (SALOMÃO et al., 2011).

Nos países em desenvolvimento, as IRAs têm um grande impacto na população em geral. Elas são a primeira causa de morte nos países de baixa renda e a quarta em países de renda média, como o Brasil (FERONE et al., 2014). No Brasil, em 2004, a mortalidade por causas de IRA foi de cinco para cada 1000 crianças, ficando em segundo lugar se excluídas as causas perinatais e malformações congênitas. No ano de 2005, ocorreram em torno de 575.000 internações por doença respiratória em crianças menores que cinco anos de idade, sendo 185.000 na região Sudeste. Somente no período de janeiro a setembro de 2006, os gastos do Ministério da Saúde foram de 135 milhões de reais com internações por bronquiolite e pneumonia em crianças menores de cinco anos de idade (PECCHINI, 2008).

As infecções causadas por vírus são os agentes etiológicos mais frequentes de infecções respiratórias agudas (PECCHINI et al., 2008). Infecções virais podem ocorrer em crianças saudáveis e crianças pequenas, apesar de recém-nascidos prematuros e doentes afetados por problemas cardíacos, pulmonares, ou distúrbios do sistema imunológico apresentarem maior risco de desenvolver doença grave, sendo que a reinfeção também ocorre com maior frequência nesses pacientes (DINIZ et al., 2005).

Sabe-se hoje da existência de 1.200 vírus que infectam o trato respiratório, embora muitos deles, provavelmente, possam não causar doença ou não resultar sintomas no paciente infectado (FIGUEIREDO, 2009). Estima-se que 90% das IRAs estão relacionadas à agentes virais, resultando em considerável morbidade e mortalidade em crianças (PECCHINI, 2008).

Foram identificadas como as causas mais comuns de IRA os vírus: sincicial respiratório (RSV), influenza A e B (Gripe A e B), coronavírus humano (CoV), rinovírus humano (HRV), adenovírus humanos (HAdV), metapneumovírus humano (hMPV) e bocavírus humanos (BoV) (HUANG et al.,

2013).

Como consequência das infecções do trato respiratório causadas por vírus, destacam-se duas manifestações clínicas comuns, uma delas é o resfriado que tem pouca gravidade e curta duração, causando geralmente cefaleia, espirros, calafrios e dor de garganta, evoluindo com coriza, obstrução nasal, tosse e mal-estar; e outra delas que é a gripe, sendo esta mais grave, de instalação súbita podendo levar a febre, cefaléia, tosse, dor de garganta, mialgia, espirros, fraqueza e hiporexia (FIGUEIREDO, 2009). Outros exemplos de síndromes clínicas que acometem o trato respiratório superior: faringite exsudativa e otite média; e no trato respiratório inferior: traqueíte, bronquite, bronquiolite e pneumonia; sendo as infecções do trato superior as mais frequentes na população (HEMMING, 1994).

1.2 HISTÓRICO DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV)

O RSV foi descrito pela primeira vez em 1956 por MORRIS e col., que isolaram o vírus a partir da secreção nasal de um chimpanzé de laboratório com infecção respiratória aguda em 1955 e recebeu a designação de "Chimpanzee Coryza Agent" (CCA) (MORRIS et al., 1956).

A associação desse vírus com doenças em humanos surgiu quando um funcionário do laboratório apresentou a doença semelhante ao animal e anticorpos específicos contra o CCA. Também confirmada um ano depois, através do isolamento do RSV da secreção orofaríngea de duas crianças com doença do trato respiratório, em Baltimore, nos Estados Unidos da América, confirmando essa evidência devido ao seu efeito citopático característico (ECP) nas culturas de células (CHANOCK et al., 1957).

Na época em que foi isolado dos animais, o vírus foi denominado de "agente da coriza do chimpanzé". Logo a seguir, foi descrito como vírus sincicial respiratório, em função de sua habilidade para induzir à formação de sincício (massa de protoplasma multinucleada produzida pela fusão de células), em cultura de tecidos e sua predileção pelo trato respiratório humano. Desde a sua descrição original, em 1956-1957, o RSV tem sido muito estudado em função de sua alta prevalência e pela importância das infecções no trato respiratório (GIUGNO, 2000).

Inicialmente o vírus foi isolado em cultura de células hepáticas, através de swab de garganta de um dos animais e posteriormente foi verificado que 100% da colônia havia sido contaminada pelo vírus. A inoculação foi realizada em diversos animais de laboratório, tais como camundongos, hamsters, coelhos, ratos e chimpanzés, o que demonstrou que os últimos foram os únicos a desenvolver sintomatologia específica para o vírus (CHANOCK et al., 1957).

No Brasil, em 1964 o RSV foi isolado de amostras respiratórias de quatro crianças com menos de seis meses de idade, com quadro de broncopneumonia e bronquiolite internadas em um hospital infantil na cidade de São Paulo. A confirmação do isolamento foi realizada utilizando-se o teste de neutralização com o soro padrão (CANDEIAS, 1967).

Já nos primeiros estudos sorológicos realizados na época mostraram que a maioria das crianças em Baltimore tinham sido infectadas com RSV antes dos quatro anos de idade. Investigações similares, em várias partes do mundo, indicaram que o RSV estava associado com doenças do trato respiratório inferior, como pneumonia e bronquiolite (NASCIMENTO, 2006). O RSV foi posteriormente considerado a causa mais importante de doença pulmonar infecciosa humana em crianças (NOAH et al., 2011).

1.3 O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

O RSV é considerado um dos principais agentes virais causadores de infecções graves do trato respiratório em lactentes e crianças no mundo todo (GARDINASSI et al., 2012) e responsável por surtos anuais em todo o mundo (LAMARÃO et al., 2012).

A infecção por RSV resulta em vários sintomas, que vão desde gripais comuns até mais graves, como a bronquiolite e pneumonia (GARDINASSI et al., 2012). A bronquiolite é a complicação clínica mais comum causada pelo RSV e está associada a eventos respiratórios mais graves (ANDRES et al., 2012). A pneumonia grave tem uma alta taxa de mortalidade, principalmente entre recém nascidos, crianças, indivíduos imunocomprometidos com doenças crônicas, cardíacas e também em idosos, esses possuem um risco particularmente elevado de desenvolver infecções respiratórias mais graves e até mesmo letais. Porém, pessoas de todas as faixas etárias podem ser

infectadas pelo RSV (PAIVA et al., 2012).

O RSV é responsável por 50-90% dos casos de bronquiolite e por aproximadamente 50% de todas as pneumonias na infância, principalmente nos meses de outono e inverno (VIEIRA et al., 2010).

Uma infecção RSV não produz imunidade à infecção subsequente, assim, reinfecções são comuns e os sintomas diminuem com o aumento da idade. Seqüelas da infecção por RSV foram observados em crianças (OLIVEIRA et al., 2008), podendo resultar em desordens respiratórias a longo prazo, tais como uma função anormal pulmonar, asma, tosse recorrente, e bronquite, sendo que a pneumonia é uma das principais causas de doença e morte nas crianças mais jovens em todo o mundo (LAMARÃO et al., 2012).

Quase todas as crianças adquirem a infecção em algum momento durante os primeiros 2 anos de vida (HASSAN et al., 2014). Na primeira infecção, 40-50% têm envolvimento do trato respiratório inferior (OLIVEIRA et al., 2008), cerca de 1-2% de todas as crianças infectadas pelo RSV necessitam de hospitalização (FAGHIHLOO et al., 2014).

Na América Latina, as infecções respiratórias continuam a ser a segunda principal causa de morte em crianças menores de 5 anos de idade, com RSV como o agente causador em 70% dessas infecções (PINEROS et al., 2013).

1.4 TRANSMISSÃO

A transmissão por RSV ocorre por contato direto através de secreção respiratória e em aerossóis contaminados. O período de incubação do vírus pode durar de dois a oito dias, a duração da excreção viral varia de acordo com a intensidade da doença e o estado imunitário do hospedeiro. Crianças previamente saudáveis com infecção podem excretar RSV aproximadamente de 5-12 dias, no entanto lactentes e imunodeprimidos podem excretar vírus por um período maior de tempo (CALEGARI et al., 2005). O vírus pode permanecer de forma viável em aventais de 45 minutos a 6 horas, em luvas de borracha por 1 hora e 30 minutos e na pele por cerca de 20 minutos (HALL et al., 1980).

A transmissão em hospitais pediátricos deve ser controlada, principalmente em crianças com fatores de risco para doença grave. Esses pacientes, quando adquirem infecção nosocomial, apresentam hospitalização

de duração prolongada e elevada taxa de mortalidade quando comparadas a crianças sem fatores de risco ou com doenças adquiridas na comunidade (LANGLEY et al., 1997; THORBURN et al., 2004).

A propagação do vírus é favorecida também em ambientes fechados, como creches ou escolas. As crianças lactentes infectadas com RSV possuem o maior reservatório viral, pois excretam grande quantidade de partículas virais, aumentando, conseqüentemente, a contaminação de indivíduos que se encontram próximos (HALL, 2001; OGRA, 2004).

1.5 PATOGÊNESE

O RSV infecta as células epiteliais das vias aéreas ciliadas do trato respiratório, causando um processo inflamatório que inclui destruição do epitélio, edema e aumento da produção de muco (HIRSH et al., 2014).

As manifestações clínicas das infecções respiratórias causadas por RSV são dependentes da idade do indivíduo e de uma exposição prévia do vírus (HIRSH et al., 2014). Os sintomas clínicos dessa doença geralmente começam com sinais e sintomas de um resfriado comum que incluem febre baixa, coriza, tosse, sibilos e a possibilidade de causar otite média aguda, limitando-se ao trato respiratório superior (HIRSH et al., 2014).

Nas infecções agudas do trato respiratório inferior ocorrem as síndromes clínicas com manifestações mais graves, sendo essas a bronquiolite e pneumonia, e geralmente ocorrem em crianças com idade inferior a 2 anos e pacientes de risco como crianças prematuras, com displasia pulmonar, doença cardíaca congênita, imunodeficiência congênita ou adquirida, transplantados e com fibrose cística (HIRSH et al., 2014). Na maioria dos casos requer hospitalização, necessitando de tratamento intensivo e ventilação mecânica, podendo resultar em morte (ALVAREZ et al., 2013). A maior frequência de hospitalização associada à RSV ocorre em crianças com menos de 6 meses de idade (chegando a 2-3 meses de idade), seguido por crianças mais velhas (6-12 meses de idade) (ANDERSON et al., 2013).

Nos Estados Unidos, demonstrou-se que 1,1 milhões de crianças com menos de dois anos foram hospitalizadas por RSV em um período de oito anos, e apresentaram maior percentual de internações entre 3 e 6 meses de

idade, afetando, assim, uma faixa da população de maior risco de agravamento da doença (ALVAREZ et al., 2013).

Além disso, a bronquiolite causada pelo RSV tem sido identificada como o maior fator de risco independente para o desenvolvimento posterior de asma e sensibilização alérgica (GUPTA et al., 2013). A bronquiolite viral aguda (BVA) é a infecção mais comum do trato respiratório inferior em lactentes, afeta cerca de 10% das crianças menores de 1 ano de idade, visto que cerca de 75% dos casos de bronquiolite são causados pelo RSV (MURRAY et al., 2014).

A BVA ocasionada pelo RSV é o resultado da infecção e da inflamação da mucosa respiratória. Os sintomas clínicos de obstrução do sistema ventilatório inferior são consequências da oclusão parcial das vias aéreas distais. Os lactentes são predispostos à BVA devido ao fato de possuírem um pequeno calibre das vias aéreas distais e pela ausência de imunidade ativa contra o RSV (CARVALHO et al., 2007). A replicação viral induz a produção de mediadores inflamatórios pelas células epiteliais respiratória, contribuindo com a patogênese da doença. A descamação destas células epiteliais respiratórias, o edema da superfície mucosa e o aumento da reatividade da musculatura lisa da via aérea ocasionam os sintomas respiratórios da BVA (CARVALHO et al., 2007). Os sintomas são caracterizados também por dificuldade respiratória, com obstrução bronquiolar e sibilos, que pode levar a uma piora clínica (MULHOLLAND et al., 1990), inapetência, vômitos e febre baixa ocasionalmente podem ocorrer. Em casos mais graves aparece a cianose, alteração da frequência respiratória e a saturação de oxigênio pode estar abaixo dos 90,0% (NUNES, 2004).

A imunidade adquirida após a primeira infecção por RSV não é suficiente para prevenir infecções subsequentes e as reinfecções pelos vírus podem ocorrer ao longo da vida, mas geralmente com um quadro mais brando da doença (ALVAREZ et al., 2013), indicando que RSV induz apenas imunidade parcial (TABATABAI et al., 2014).

1.6 ASPECTOS ESTRUTURAIS DO RSV

O vírus sincicial respiratório (RSV) está classificado no gênero *Pneumovirus*, da ordem *Mononegavirales*, da família *Paramyxoviridae* e

subfamília *Pneumovirinae*, é composto por um envelope com genoma de RNA de sentido negativo não-segmentada, com fita simples e peso molecular de 5×10^3 KDa, contendo 15222 nucleotídeos (OLIVEIRA et al., 2008; GARDINASSI et al., 2012).

O vírus é composto de nucleocapsídeo de simetria helicoidal envelopado (MASTRANGELO & HEGELE, 2013), é pleomórfico com diâmetro variando de 150nm a 300nm (HUANG et al., 2013). Envolto por envelope lipoprotéico, com tamanho variando de 100nm a 230nm. Do envoltório projetam-se espículas de glicoproteínas de superfície de 11nm a 20nm de comprimento, em intervalos regulares de 6nm a 10nm (NUNES, 2004).

Figura 1 – Representação esquemática do RSV

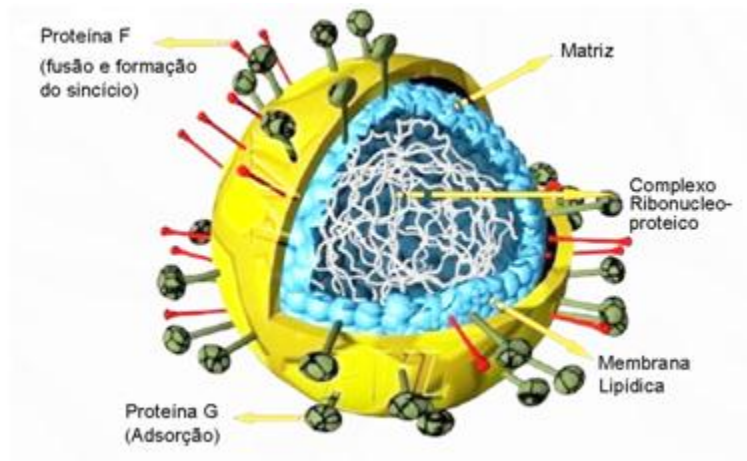


Figura adaptada de NASCIMENTO, 2006.

O RSV tem um genoma viral com 10 genes de RNA mensageiro (mRNA) que codificam 11 proteínas (NOAH et al., 2011). A pequena proteína hidrofóbica SH, pode ser uma proteína de membrana, mas também é expressa na superfície de células infectadas pelo RSV. As proteínas da matriz, M e M2, não são glicosiladas e estão localizadas internamente no envelope viral, a primeira medeia a associação do nucleocapsídeo com o envelope nascente; a segunda ainda não tem função definida (NUNES, 2004).

A nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P) e a polimerase (L) estão associadas ao nucleocapsídeo viral. A nucleoproteína N é a maior proteína estrutural do nucleocapsídeo, permanece ligada ao RNA genômico viral durante a replicação e transcrição, as outras duas estão envolvidas com processos de transcrição e replicação (COSTELLO et al., 2012).

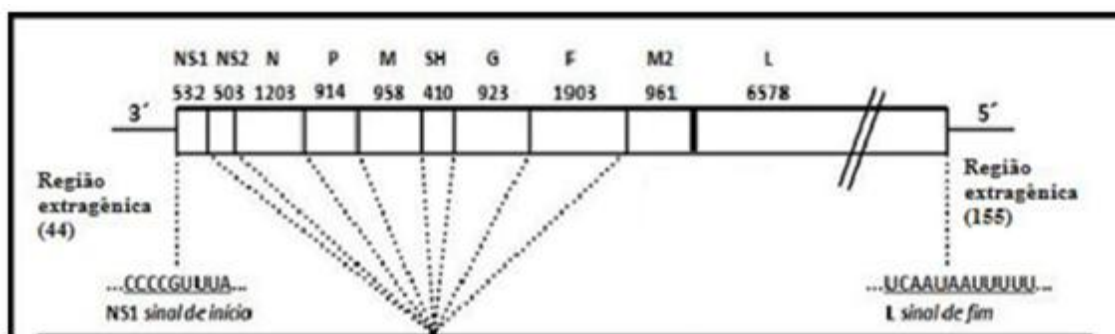
Dois proteínas não estruturais NS1 e NS2 com funções desconhecidas, porém parecem estar envolvidas na regulação de um equilíbrio entre a transcrição e a replicação do RNA (KOSAKA et al. 2004).

O RSV é um vírus com envelope, que deve ligar a célula alvo a sua membrana para fundir com a membrana da célula e liberar o genoma viral no citoplasma, iniciando a infecção. Duas glicoproteínas de superfície transmembranas realizam a fusão, as glicoproteínas G e F (COSTELLO et al., 2012). Elas são encontradas na forma de espículas na superfície do envelope viral e tem um papel fundamental na resposta imune durante a infecção (NUNES, 2004).

A proteína G de RSV é uma glicoproteína heterogênea, responsável pelas principais diferenças, que define os dois subtipos de vírus sincicial (A e B). Para além do seu papel na fixação do vírus à superfície da célula, a proteína G de RSV também ajuda o vírus para escapar ao sistema imunitário do hospedeiro, imitando citocinas celulares e através derramamento. A fusão do vírus com a membrana da célula, bem como a formação de sincícios, o efeito citopático característico de RSV, é mediada pela proteína F do vírus. A proteína G varia consideravelmente em sequência entre os subtipos A e B, já a proteína F, ao contrário da G, é uma proteína neutralizante, pois está conservada em ambos os subtipos de RSV (MASTRANGELO & HEGELE 2013).

A transcrição do genoma viral ocorre no sentido 3'-5'. A região terminal 3' do RNA genômico é composta de um segmento extragênico de 44 nucleotídeos, que contém o promotor viral. Os primeiros 30 nucleotídeos desta região, conhecida como *leader*, são suscetíveis à inativação por inserção ou deleção de nucleotídeos. Após essa região seguem-se dez genes dispostos na seguinte ordem: 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'. O último gene, o (L), é seguido por uma região extragênica, *trailer*, com 155 nucleotídeos que é mais tolerante à inserção ou deleção de nucleotídeos (SULLENDER, 2000). A figura 2 representa o mapa gênico do RSV.

Figura 2- Organização Genômica do Vírus Sincicial Respiratório



Os genes são identificados de acordo com a proteína que codifica e estão listados ao longo da parte superior do mapa. Os números abaixo dos nomes de cada gene correspondem ao tamanho, em nucleotídeo do gene completo. Os números entre parênteses correspondem ao tamanho, em nucleotídeos, das sequências apontadas. Figura adaptada de PERDIGÃO, 2009.

Isolados de RSV são divididos em dois grupos de características antigênicas e genéticas: A e B (OLIVEIRA et al., 2008), com base nas diferenças antigênicas existentes das suas glicoproteínas G e F (HIRSH et al., 2014). A existência de dois grandes grupos antigênicos de RSV, os grupos A e B, foi claramente estabelecida (MOURA et al., 2003), onde vários genótipos RSV-A foram identificados em diferentes regiões geográficas, que incluem GA1 a GA7, SAA1 (África do Sul, A1), NA1 e NA2 e, mais recentemente ON1. Treze genótipos RSV-B atualmente conhecido e designado como GB1 para GB4, SAB1 para SAB3 (África do Sul), e BA1 para BA6 (Buenos Aires) (GARDINASSI et al., 2012).

A variabilidade de sequência (G) do gene da proteína, que mostra as

maiores diferenças antigênicas e genéticas entre os dois grupos RSV, é comumente usado para genotipagem de RSV-A e RSV-B. A proteína G é uma glicoproteína de 289-299 aminoácidos de comprimento do tipo II, que consiste na cauda citoplasmática (ácidos aminados [aa] 1-38), o domínio transmembranar (aa 38-66), e o ectodomínio (aa 66-298) (GARDINASSI et al., 2012), e responsável pela fixação do vírus (FAGHIHLOO et al., 2014). O ectodomínio de C-terminal da proteína L é composto de duas regiões variáveis, separadas por uma região altamente conservada entre os aminoácidos 164 e 176 assumidos para representar um local de ligação do receptor. As duas regiões variáveis do ectodomínio contêm altos resíduos de serina e treonina, que são locais de aceitadores potenciais para açúcares ligados a O que afetam a estrutura antigênica da proteína G, bem como impacto sobre a infectividade do vírus (GARDINASSI et al., 2012).

Cepas virais são separadas em dois grandes grupos com base em sua variabilidade genética e antigênica. Várias linhagens dentro do subtipos RSV-A e RSV-B isolados co-circulam (TABATABAI et al., 2014) durante a maior parte das epidemias, e as suas proporções relativas podem variar nesse período, mas geralmente o grupo A predomina ao grupo B (FAGHIHLOO et al., 2014).

O RSV é extremamente lábil, sendo sensível às variações de temperatura, pH e à ação de compostos químicos. A temperatura de 37°C ocorre inativação de 90% dos vírus em 24 horas. Congelamento lento e descongelamento resultam inativação. Para sua preservação, o RSV deve ser congelado rapidamente e estocado a -70°C. O RSV é rapidamente desnaturado em pH baixo e seu pH ótimo é em torno de 7,5 (NUNES, 2004).

1.7 EPIDEMIOLOGIA DO RSV

A incidência anual global da infecção por RSV em crianças menores de 5 anos foi estimada em 34 milhões de casos por ano, com pelo menos 10% de episódios que representam infecções graves que necessitam de internação hospitalar (ZOMER-KOOIJKER et al., 2014).

Ao longo dos últimos 20 anos, estudos epidemiológicos têm demonstrado a associação entre RSV e bronquiolite, levando a um subsequente desenvolvimento de chiado e asma em crianças até a idade

escolar (ZOMER-KOOIJKER et al., 2014).

Há aproximadamente 160.000 mortes causadas por RSV no mundo a cada ano, principalmente no mundo em desenvolvimento, onde o acesso aos cuidados de apoio a saúde é limitada (COSTELLO et al., 2012).

Infecção por RSV causa hospitalização em 2% da população pediátrica e provoca um curso clínico mais grave, com até 20% de hospitalização em prematuros relataram a doença respiratória ocorrida em 1955, e isolada a (idade gestacional inferior à 36 semanas) e crianças com displasia broncopulmonar, doença cardíaca congênita, ou neuromuscular (PIÑEROS et al., 2013). RSV é a causa mais importante de infecção respiratória em crianças pequenas em todo o mundo, infectando praticamente todas as crianças nos primeiros anos de vida. Um em cada 100 ou 200 crianças infectadas requer hospitalização, geralmente por bronquiolite. Portanto, enfermarias pediátricas são inundados por pacientes com RSV adquirida a cada inverno, e a inobservância dos procedimentos de controle de infecção leva inevitavelmente a transmissão nosocomial. RSV também tem um forte impacto sobre os membros da equipe de enfermagem e médica, com taxas de ataque em alguns estudos que se aproximam de 50%. Pois o inverno é a época do ano em enfermarias pediátricas, os funcionários doentes raramente tem tempo para se recuperar, servindo assim como vetores na transmissão da doença (GOLDMANN, 2001).

Estudos mostram que o RSV causa cerca de 33,8 milhões de casos de infecção do trato respiratório inferior e 3,3 milhões desses casos são graves para internações anuais (SCHEPENS et al., 2014) e pelo menos 66.000 a 199.000 mortes de crianças menores de 5 anos de idade no mundo todo (MENG et al., 2014) devido a complicações (SCHEPENS et al., 2014).

A mortalidade por infecção pelo RSV ocorre principalmente em países em desenvolvimento, onde as estimativas são incertas (ANDERSON et al., 2013). Nos países industrializados, as mortes por RSV são raras (0,7% do total) e ocorrem quase que exclusivamente em crianças menores de 1 ano. No entanto, nos países em desenvolvimento, as infecções RSV fatais são mais frequentes, cerca de 2,1% de todos os casos graves de RSV (SCHEPENS et al., 2014).

Mais de 95% das crianças é infectadas com RSV até os 2 anos de

idade, e aproximadamente 50% das crianças infectadas no primeiro ano de vida são reinfectadas durante o segundo ano (GUPTA et al., 2013). Embora na maioria das crianças a replicação por RSV permaneça restrita ao trato respiratório superior, a infecção pode se espalhar regularmente para o trato respiratório inferior, causando bronquiolite (SCHEPENS et al., 2014).

A BVA causada por RSV é a infecção primária das vias aéreas inferiores em crianças menores de 2 anos de idade e é a principal causa de internação nessa faixa etária nos países desenvolvidos (ALVAREZ et al., 2013). RSV é o agente responsável pela BVA em 41,7% a 83,6% dos casos. No Brasil, o RSV foi responsável por 31,9% a 64% dos pacientes hospitalizados com BVA no ano de 2013 (ALVAREZ et al., 2013).

A BVA por RSV leva a uma mortalidade significativa no mundo em desenvolvimento, com até 200 mil mortes por ano em crianças pequenas em todo o mundo. Os resultados de infecção por RSV na doença inflamatória do trato respiratório inferior ocorre em cerca de 30% das crianças que são infectadas e em aproximadamente 2% de todos os recém-nascidos (CURRIE et al., 2013). Estima-se que ocorram de 3.000 a 4.000 mortes por ano nos Estados Unidos devido a BVA causada por RSV.

A prevalência de hospitalização por RSV nos Estados Unidos é de 48,9 por 1.000 em crianças com menos de 3 meses, 26 por 1.000 em menores de 1 ano, e 1,8 por 1.000 em crianças de 1 a 5 anos (ALVAREZ et al., 2013). Ainda nos Estados Unidos, ocorrem entre 132.000 e 172.000 hospitalizações anuais associadas ao RSV em crianças com menos de 5 anos de idade, com as maiores taxas de hospitalização observada em lactentes (MENG et al., 2014).

Nos Estados Unidos, há em média 22,8 visitas à salas de emergência causadas por RSV por 1.000 crianças, 29% dos quais estão hospitalizados. Isso representa uma despesa anual de 50,5 milhões de dólares em atendimentos de emergência e 650 milhões de dólares em hospitalizações.

Em outras regiões, a taxa de hospitalização por 1.000 crianças com RSV varia de 8,7 na Austrália até 60 no Japão. Na Austrália, a incidência do RSV é 110-226,5 por 1.000 crianças e o custo anual é estimado em 50 milhões de dólares. Na Europa, o RSV é responsável por 45% das internações por infecção respiratória do trato inferior em crianças menores de 2 anos.

No Brasil, um estudo de 5.304 crianças menores de 1 ano mostrou que

113 (2,1%) foram hospitalizadas por BVA. Entre as crianças hospitalizadas por RSV, 2,7% foram internados na unidade de terapia intensiva (UTI), 1,5% necessitaram de assistência ventilação, e 0,2% foram a óbito (ALVAREZ et al., 2013).

Na cidade de São Paulo, um estudo prospectivo revelou que 62,7% das crianças hospitalizadas tinham infecção no trato respiratório inferior, dentre os quais 56,4% tinham um vírus como agente etiológico, sendo que o RSV foi identificado em 52,4% dos casos (CALEGARI 2005).

1.8 SAZONALIDADE

Em relação à sazonalidade, a incidência de infecção por RSV varia de acordo com a latitude, altitude e clima de cada uma das regiões (PIÑEROS et al., 2013). Em países de clima temperado as epidemias RSV ocorrem anualmente nos meses de inverno e em climas tropicais o padrão varia de acordo com a maioria dos locais na literatura, estando associado RSV com a estação das chuvas (LAMARÃO et al., 2012).

No Brasil, o RSV predomina particularmente nos meses de abril a agosto/setembro de cada ano. Salomão et al. (2011), estudando a ocorrência do RSV em nove diferentes cidades do mundo, constataram aumento da ocorrência de infecção pelo vírus em uma faixa de umidade relativa do ar entre 45-65%.

Durante as epidemias, o Grupo A ou o B de RSV pode ser predominante, ou ambos os grupos podem circular simultaneamente (LAMARÃO et al., 2012).

1.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O conhecimento do perfil das diversas doenças respiratórias agudas causadas por vírus e o seu diagnóstico poderiam permitir a diferenciação destas das infecções bacterianas, evitando muitas vezes, a prescrição desnecessária de antibióticos e, assim, permitir a utilização de drogas antivirais apropriadas para o tratamento (D'ELIA et al., 2005).

Do ponto de vista clínico, a detecção de etiologia viral tem vantagens,

tais como a identificação de pacientes em risco, estabelecendo contato de isolamento para evitar infecções hospitalares e melhorar o acompanhamento do paciente após a alta (RICCETTO et al., 2009).

As amostras respiratórias mais frequentes utilizadas para a detecção do RSV incluem swabs nasal e orofaríngeo, lavado e aspirado nasofaríngeo, que fornecem um material rico em células humanas para análise (NUNES, 2004).

O isolamento viral em culturas de células é considerado o teste de diagnóstico padrão ouro para o diagnóstico do RSV (REIS et al., 2008). O cultivo celular, além de ser um método sensível no diagnóstico do RSV, permite fazer a detecção de pequenas quantidades de vírus e disponibiliza um maior número de microrganismos, o que pode ser necessário quando uma análise posterior é requerida (HALONEN et al., 1996). O isolamento em cultura de células pode ser realizado pela ampla variedade de células humanas e animais, sendo as mais utilizadas HEp-2 (carcinoma de laringe humano) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano), porém a cultura de células é um método de diagnóstico que demanda um tempo maior para obtenção do resultado, quando comparado a outras metodologias. Devido ao fato do RSV ser lábil, o manuseio e transporte da amostra a ser diagnosticada por cultivo celular devem ser manipulados com cuidado (NUNES, 2004).

No entanto, as técnicas rápidas, tais como a detecção de antígeno, utilizando anticorpos monoclonais, a partir de secreções respiratórias (REIS et al., 2008) fornecem resultados rápidos, apresentando sensibilidade e especificidade comparáveis ao isolamento viral. São menos trabalhosos, podem ser utilizados em amostras expostas a temperaturas deletérias à viabilidade do RSV para cultivo celular e possuem a detecção do vírus num período mais avançado da infecção (WHO, 2000). Nessa técnica, o uso de anticorpos monoclonais permite um grande aumento da sensibilidade desses métodos e propicia o fornecimento contínuo de reagentes de especificidade definida (CUBIE et al., 1990; SIQUEIRA et al., 1993). Os principais testes são *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e Imunofluorescência (IF), que são as técnicas mais utilizadas e estão na apresentação de kits comerciais. Podem ser utilizados isolados ou em conjunto com o isolamento viral em cultura de células para caracterização antigênica e confirmar resultados (NUNES, 2004).

Além de utilizar os testes descritos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se tornado um teste muito utilizado, pois proporciona uma elevada sensibilidade e especificidade (REIS et al., 2008). A transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) apresenta sensibilidade igual ou superior ao da cultura de células, ou ensaios de detecção de antígenos. Com base no método de PCR, a análise molecular e filogenética de vírus isolado pode ser efetuada, permitindo a classificação em grupos e subgrupos (REIS et al., 2008). Essa técnica permite a detecção de quantidades mínimas de RNA e a caracterização dos grupos antigênicos do vírus, fornecendo resultados rápidos. Variações na metodologia, como a multiplex RT-PCR, pode-se detectar e subtipar conjuntamente diferentes vírus em uma mesma amostra clínica coletada de paciente com suspeita de infecção respiratória (STOCKTON et al., 1998).

Vários estudos avaliam o impacto da utilização de técnicas rápidas sobre a evolução clínica dos pacientes em comparação com as técnicas convencionais. Em pacientes imunocomprometidos, especialmente receptores de transplante de medula óssea e de recém-nascidos prematuros, isto é particularmente importante uma vez que esses pacientes necessitam de intervenção terapêutica rápida. Além disso, o diagnóstico rápido permite rápida implementação de políticas de controle de infecção por RSV, reduzindo assim as infecções nosocomiais (REIS et al., 2008).

Apesar da importância clínica das IRA, a maioria dos serviços de saúde não apresenta disponibilidade para diagnóstico em culturas de células e métodos sorológicos. Poucos dispõem das novas técnicas diagnósticas por imunofluorescência direta e indireta, imunoenaios enzimáticos e reação em cadeia de polimerase (PCR). O reconhecimento de IRA viral no esclarecimento etiológico das infecções do trato respiratório possibilita postura terapêutica mais adequada, e redução dos gastos com tratamento antibiótico. Vários fatores concorrem para resultados inferiores do que ao esperado, são eles a utilização de uma técnica apenas, atraso do momento de coleta da secreção, tipo e local do material coletado, escolha do método ou associação de métodos (RODRIGUES, 2004).

A escolha da técnica a ser empregada no diagnóstico do RSV depende das instalações do laboratório, do número e tipo de amostras coletadas,

volume dessas amostras, além de equipamentos e reagentes disponíveis no laboratório e de pessoas treinadas para a realização dos testes (HALONEN et al., 1996; HALSTEAD et al., 1990).

Independente do método de escolha, a realização do diagnóstico das infecções causados por RSV é de grande importância na obtenção de dados epidemiológicos, úteis no desenvolvimento de programas de controle de prevenção dessas doenças, além de orientar condutas terapêuticas adequadas para redução no número de prescrições desnecessárias de antibióticos (NUNES, 2004).

Estudo feito por SAVY et al. (1996) mostrou o estabelecimento do tratamento com antibióticos em 61,2% de crianças com menos de quatro anos, internadas com IRA. Em 37,4% desses pacientes o diagnóstico virológico foi posteriormente confirmado, havendo um predomínio do RSV em 78,8% dos casos (SAVY et al., 1996).

1.9.1 VACINA E TRATAMENTO

Atualmente, a única opção disponível para prevenir a doença mediada por RSV é a administração de uma imunoterapia passiva profilática, o Palivizumab (Synagis ®) (RIGTER et al., 2013; MURRAY et al., 2014). Desenvolvido pela MedImmune, vendido pelo Laboratório Abbott (COSTELLO et al., 2012), o Palivizumab é um anticorpo monoclonal humanizado (MAb), dirigido contra um epítipo no local antigênico da proteína F do RSV, eficaz na redução da incidência e gravidade de infecções por RSV em crianças de alto risco. Crianças com maior risco de infecção por RSV que se incluem para o uso da profilaxia são aqueles que nasceram prematuramente e aqueles com doença cardíaca congênita, doenças pulmonares crônicas ou imunocomprometidos (ANDRES et al., 2012).

A prevenção de infecção nas crianças, durante o período de circulação do vírus é particularmente importante (OLIVEIRA et al., 2008). É indicado que se administre a profilaxia mensalmente por via intramuscular, a uma dosagem de 15 mg/kg de peso corporal durante a temporada de RSV, fornecendo cerca de cinco injeções para cobrir a atividade sazonal mais importante do vírus (RESCH, 2014). No entanto, seu uso é restrito a crianças consideradas com

alto risco de desenvolver a doença respiratória grave devido ao fato dos anticorpos monoclonais humanizados possuírem custos elevados (RIGTER et al., 2013).

O custo estimado para uma dose única mensal de Palivizumab para uma criança com idade entre 6 meses, pesando 7,5 kg, é £ 1.023,11 de modo que o custo total para mais de 5 doses a temporada de inverno é mais de £ 5.000,00 por paciente (MURRAY et al., 2014). O que representa uma grande barreira para a implementação de programas de prevenção. O alto custo dessa proteção é particularmente limitante em países de baixa renda, onde o risco de infecções respiratórias virais graves é maior (PAIVA et al., 2012). Ainda assim, a relação custo-eficácia da profilaxia com palivizumab pode ser melhorado através da restrição da sua utilização aos meses de maior circulação do RSV, com a primeira dose mensal administrada pouco antes do início da atividade do RSV. A compreensão precisa da dinâmica e tempo de surtos RSV, portanto, é crucial para garantir que a população vulnerável seja protegida quando RSV está circulando (PAIVA et al., 2012). Após a introdução do palivizumab, foi observada uma redução de 48% nas internações de crianças com doença pulmonar crônica da prematuridade (ALVAREZ et al., 2013).

A única droga antiviral que pode ser utilizada para o tratamento, permitida para a intervenção terapêutica do RSV, é a ribavirina, um análogo de nucleosídeo (NOAH et al., 2011). Contudo, seu uso tem sido amplamente interrompido devido à sua eficácia *in vivo* (COSTELLO et al., 2012), que sofre de passivos tóxicos graves e que limita o seu uso particularmente em crianças (NOAH et al., 2011). Embora seus efeitos colaterais incluam um aumento do risco para a anemia hemolítica e teratogenicidade, ainda assim continua a ser uma terapia antiviral aprovada (NOAH et al., 2011).

Como não existe uma terapia antiviral ou anti-inflamatório eficaz para RSV, o tratamento dos casos mais graves é dirigido principalmente para o suporte de vida do paciente, incluindo reposição de fluidos, suprimento de oxigênio e ventilação mecânica (SCHEPENS et al., 2014).

Uma compreensão mais clara dos fatores de defesa do hospedeiro que contribuem para a proteção efetiva contra RSV na maioria das pessoas expostas ao vírus devem ser estudadas a fundo para obtenção de maiores informações para o desenvolvimento de estratégias profiláticas ou terapêuticas

(CURRIE et al., 2013). Um dos principais obstáculos voltado para o desenvolvimento de uma vacina com proteção duradoura é a aparente incapacidade de infecções RSV naturais para induzir imunidade protetora. Isso é ilustrado pela recorrência de infecções RSV em todas as faixas etárias e a elevada taxa de infecções RSV em crianças com anticorpos neutralizantes RSV maternos. Mesmo pessoas saudáveis, com altos níveis de anticorpos neutralizantes no soro pode ser reinfectado, mesmo com a mesma cepa RSV dentro de 2 a 6 meses (SCHEPENS et al., 2014).

As vacinas utilizadas para prevenir ou tratar doenças infecciosas tem como objetivo de imitar, pelo menos parte, a resposta imune do hospedeiro que acompanha a recuperação de uma infecção natural. Em muitos casos, isto implica a indução de anticorpos neutralizantes contra as principais proteínas de superfície viral. Da mesma forma, a maioria das proteções que vem sendo estudadas para o RSV tem como alvo a indução de anticorpos neutralizantes de RSV dirigidos quer contra a proteína de ligação de RSV (G) ou a proteína de fusão (F) (SCHEPENS et al., 2014), estas glicoproteínas são responsáveis pela fixação do vírion a uma célula hospedeira e fusão de membrana com a sua membrana da célula (COSTELLO et al., 2012). Porém, apesar desta estratégia ser amplamente explorada, ainda não produziu uma vacina RSV eficaz (SCHEPENS et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência da infecção respiratória aguda causada pelo Vírus sincicial respiratório em indivíduos sintomáticos nos atendimentos de serviço de assistência primária pública na cidade de Guarapuava-PR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronização e otimização de metodologia molecular para detecção de Vírus sincicial respiratório por RT-PCR.

Detectar a ocorrência de Vírus sincicial respiratório em pacientes com sintomas de infecção respiratória aguda na cidade de Guarapuava- Paraná.

Descrever a apresentação clínica, possíveis fatores de risco e medicamentos utilizados pelos pacientes com infecção respiratória aguda.

3. METODOLOGIA

3.1 POPULAÇÃO E INCLUSÃO DE CASOS

Foram incluídos no estudo pacientes de todas as faixas etárias atendidos nos serviços de assistência primária à saúde da rede de pública, como postos de saúde no município de Guarapuava- Paraná.

A cidade de Guarapuava está localizada na porção centro-oeste do Estado do Paraná, possui uma extensão territorial de 3.177.598 Km² e altitude de 1.120,00 m (IBGE, 2014). A cidade possui uma população estimada em 175.779 habitantes, sendo essencialmente urbano, onde cerca de 90% da sua população reside. O índice do desenvolvimento humano é 0,731, ficando em 78º lugar no ranking do estado do Paraná (IPARDES, 2013).

A região de Guarapuava se caracteriza por apresentar clima Subtropical Mesotérmico Úmido, tendo como principais características a ocorrência de verões frescos (temperatura média inferior a 22°C), invernos com eventos de geadas severas e frequentes (temperatura média superior a 3°C e inferior a 18°C) e a ausência de estação seca. A precipitação média anual da região é de aproximadamente 1800 mm (WAGNER, 2009).

A inclusão dos indivíduos no estudo ocorreu a partir da procura de pacientes com sintomas de gripe ou resfriado ao posto de saúde da Vila Carli e que concordaram em participar do estudo, sendo entrevistados e coletando amostras de secreção nasal ou nasofaríngea.

A coleta das amostras foi realizada durante os anos de 2013 e 2014, houve a procura de pacientes durante o ano todo pelos pesquisadores. No momento da coleta da amostra clínica para a detecção do agente etiológico em laboratório, um pesquisador da equipe abordou e explicou sobre o projeto para os participantes ou pais responsáveis, quando criança, e após sua concordância na participação do estudo e assinatura que foi formalizada através de um consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), Cada paciente incluído no estudo foi questionado pelo pesquisador quanto aos sintomas clínicos apresentados, além dos dados demográficos, fatores de risco associados à infecção pelo RSV e utilização de medicamentos considerados relevantes para o estudo, conforme modelo de questionário (Anexo 2).

Em relação ao quadro clínico, foram investigados: o tempo de início dos sintomas; quais os sintomas respiratórios em geral tais como febre, coriza, tosse, dor de garganta, cefaléia, mialgia e calafrios; a presença de comorbidades como diabetes, hipertensão arterial, tabagismo, asma, doenças metabólicas, cardiopatias e gestação; também foi questionado aos pacientes quanto às terapias farmacológicas utilizadas e se houve vacinação. Esses dados foram relatados pelos participantes ao pesquisador do estudo no momento da coleta da amostra.

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UNICENTRO (156852/2013).

3.2 AMOSTRAS CLÍNICAS

Cada paciente incluído no estudo teve uma amostra de secreção nasal coletada através da inserção de um swab rayon estéril, cerca de 2 a 3 centímetros, em uma das narinas fazendo movimentos circulares. Após esse procedimento, as amostras frescas foram acondicionadas em um tubo falcon estéril contendo solução fisiológica 0,9% e devidamente identificados. Essas foram transportadas sob refrigeração até o laboratório de Virologia e Biologia Molecular da UNICENTRO. Em seguida essas amostras foram levadas até uma cabine de fluxo e centrifugadas em vórtex, colocadas em microtubos eppendorf de 1500 μ L e armazenadas sob congelamento a -70°C até o momento da extração do ácido nucléico.

3.3 CEPAS CONTROLE

Amostras de cepas controles de RSV foram gentilmente cedidas Doutor Celso Granato do Laboratório de Virologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.4 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

Primeiramente, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente. Foram utilizados 200 μ L da amostra descongelada e a extração foi

realizada utilizando o Kit comercial “QIAamp viral RNA” (Qiagen GmbH., Alemanha), conforme as instruções do fabricante. Em seguida, o RNA viral extraído foi utilizado nas reações de RT-PCR.

3.5 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

Para cada amostra foi gerado o cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar) através da mistura de 10µL de RNA extraído das amostras respiratórias e 1µL da solução do iniciador randômico a 200ng/µL (Random Primer, Invitrogen, EUA), colocadas em um microtubo de 200µL e aquecidos a 80°C por 10 minutos, com posterior resfriamento a 4°C, por 5 minutos. Logo após, foi adicionada a mistura de reagentes para a transcrição reversa (tabela 1), constituída por água de grau molecular (equipamento MiliQ, Millipore, EUA), MgCl₂ (Invitrogen, EUA), tampão concentrado 5 vezes (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) dATP, dTTP, dCTP, dGTP, enzima transcriptase reversa “Moloney Murine Leukemia Virus” (MMLV-RT) (Invitrogen, EUA) e inibidor de RNase (Invitrogen, EUA) para obtenção de um volume final de 25µL. Após a homogeneização, a síntese do cDNA foi realizada em termociclador Multigene TC 9600G (Labnet Laboratory, EUA) a 42°C durante 60 minutos, seguido de 70°C por 15 minutos. Após este procedimento, as amostras foram submetidas a ciclos da PCR para amplificação do vírus sincicial respiratório em microtubos de 200µL.

Tabela 1 - Reagentes utilizados na reação de Transcrição Reversa (RT)

Componentes	Concentração	Volume da reação
	inicial	Inicial
Água Mili-Q	-	4,5µL
Tampão	5X	5µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50mM	2µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	20mM	1µL
Rnase Out inibitor (Invitrogen®)	40U/µL	0,5µL
MML-V (Invitrogen®)	200U/µL	1µL

3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

Para a detecção do Vírus sincicial respiratório foi realizada a reação de PCR, que utilizou os primers que amplificam um fragmento de 838 pares de base utilizando os iniciadores: RSVAB *forward*: GTCTTACAGCCGTGATTAGG na posição do gene N, RSVAB *reverse*: GGGCTTTCTTTGGTACTTC na posição do gene P, ambos no sentido (5'-3'), o gene N apresenta 1203 nucleotídeos e o gene P 914 nucleotídeos. Os iniciadores oligonucleotídicos desenhados para amplificar RSV foram colocados nas regiões N e P do genoma, porque essas são altamente conservadas e são regiões do genoma RSV que permitem subtipos de estirpes de RSV para RSV A e tipo B (STOCKTON 1998).

Foram utilizados para a reação de amplificação 5µL de cDNA e 20µL da mistura de reagentes demonstrada na tabela 2. Contendo cada reagente devidamente padronizado, dentre eles estão a água de grau molecular (obtida de filtro MiliQ–Millipore, EUA), MgCl₂ (Invitrogen, EUA), tampão para esta reação concentrado 10 vezes (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), primers *forward* e *reverse*, enzima *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen, EUA), com volume final da reação de 25µL.

Após a homogeneização em vórtex, a amplificação foi realizada em termociclador Multigene TC 9600 G (Labnet Laboratory, EUA), as amostras foram submetidas a uma etapa de desnaturação de 95°C por 5 minutos, foram realizados 40 ciclos de amplificação de repetidas variações de temperatura: 94°C por 30 segundos; 54°C por 45 segundos; e 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Em seguida, o produto desta amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2%, por uma hora a 140 volts (V).

Tabela 2 - Reagentes utilizados na amplificação de RSV

Componentes	Concentração inicial	Volume da reação inicial
Água Mili-Q	-	13,55µL
Tampão	10X	2,5µL
MgCl ₂	50mM	1,75µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	20mM	1µL
Primer Forward	20µM	0,5µL
Primer Reverse	20µM	0,5µL
<i>Taq</i> DNA polymerase	5U/µL	0,2µL

3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE UTILIZANDO O PCR SuperMix®

Para a detecção do Vírus sincicial respiratório também foi realizada a amplificação através da reação com o PCR SuperMix® (Invitrogen, Brasil), que é um mix de reagente prontos contendo Mg²⁺, dNTPs e *Taq* DNA polymerase recombinante em concentrações suficientes para permitir a amplificação do vírus durante a PCR (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION, 2010).

Para esta reação de amplificação foram utilizados os mesmos primers descritos anteriormente, acrescidos de 5µL de cDNA e 20µL dos componentes da reação, demonstrado na tabela 3, contendo água de grau molecular (obtida de filtro MiliQ–Millipore, EUA), PCR SuperMix® (Invitrogen, Brasil), Primers Foward e Reverse, com volume final da reação de 25µL.

Após a homogeneização em vórtex, a amplificação foi realizada em termociclador Multigene TC 9600 G (Labnet Laboratory, EUA), as amostras foram submetidas a uma etapa de desnaturação de 95°C por 5 minutos, foram realizados 40 ciclos de amplificação de repetidas variações de temperatura: 94°C por 30 segundos; 54°C por 45 segundos; e 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Em seguida, o produto desta amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2%, por uma hora a 140 volts (V).

Tabela 3 - Reagentes para amplificação de RSV utilizando um Mix de reagentes prontos PCR SuperMix®

Componentes	Concentração	Volume da reação
	Inicial	Inicial
Água Mili-Q	-	8,5µL
PCR SuperMix®	1X	10,5µL
Primer Forward	20µM	0,5µL
Primer Reverse	20µM	0,5µL

3.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,2%, diluído em tampão Tris/borato/EDTA - TBE (Tris 0,089M; ácido bórico 0,0089M; EDTA 0,002M pH 8,0), que continha 0,5µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen, EUA). O gel foi preparado em cubas de eletroforese horizontal. Um volume de 7,5µL do produto amplificado foi misturado com 2,5µL da solução de corante azul de bromofenol (0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30% em água destilada) e aplicado a cada espaço correspondente para corrida. Para cada eletroforese foi reservada o primeira espaço para aplicação do padrão de peso molecular de 100pb a 1µg/µL que correspondia a 4µL do marcador (DNA Ladder, Invitrogen, EUA) com 2,5 µL da solução de corante azul de bromofenol (0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30% em água destilada).

A corrida em cuba horizontal de eletroforese foi realizada utilizando como tampão de corrida TBE 0,5X (Tris 1M; ácido bórico 0,9M; EDTA 0,00M pH 8,4) a uma voltagem de 140V por 60 minutos. A análise do gel foi realizada através da visualização em transiluminador de luz ultravioleta Alphamager HP (Protein Simple, EUA) utilizando o software Alphaview versão 3.4.

3.9 OTIMIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DA RT-PCR

Para otimização da técnica de PCR foram utilizadas cepas controles de RSV e controle negativo (água de grau molecular), sendo assim foram realizadas algumas variações nos componentes da reação, através de

diluições variadas das cepas controles, a fim de melhorar o rendimento da reação com base na intensidade do brilho das bandas após a amplificação do material genético, sem o aparecimento de bandas inespecíficas.

3.9.1 LIMITE DE DETECÇÃO

Foram realizados diluições das cepas controles antes da extração de ácido nucléico: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} para obtenção do parâmetro do limite de detecção. Esta análise foi realizada através da intensidade do brilho das bandas de 838 pares de base, sem a observação de bandas inespecíficas.

3.9.2 VARIAÇÕES NA TEMPERATURA DE ANELAMENTO

Durante a PCR, foram realizadas variações da temperatura de anelamento dos primers em termociclador, sendo estas de 52,5°C; 52,9°C; 54°C e 55,1°C. A temperatura de melhor rendimento na reação foi considerada pela análise da intensidade do brilho da banda específica em gel de agarose após eletroforese.

3.9.3 VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DO CLORETO DE MAGNÉSIO

Concentrações de $MgCl_2$ também foram testadas na tentativa de favorecer a reação de PCR. As concentrações finais de $MgCl_2$ testadas na PCR foram: 3,0mM ; 3,5mM e 4,0mM na diluição de RSV a 10^{-2} para RT-PCR.

3.9.4 VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA TAQ DNA POLIMERASE

A enzima *Taq* DNA polimerase foi testada nas concentrações finais de 1U/ μ L; 2U/ μ L e 3U/ μ L com RSV na diluição (10^{-2}) também na tentativa de melhorar o rendimento na reação.

3.9.5 ESPECIFICIDADE ANALÍTICA DOS PRIMERS

Os iniciadores forward- GTCTTACAGCCGTGATTAGG e reverse GGGCTTTCTTTGGTTACTTC foram testados para cepas controles de vírus Influenza e Rinovírus cedidas gentilmente pelo Dr. Celso Granato do laboratório da UNIFESP em São Paulo.

3.9.6 METODOLOGIA RT-PCR APLICADA NAS AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS INCLUSAS NO ESTUDO

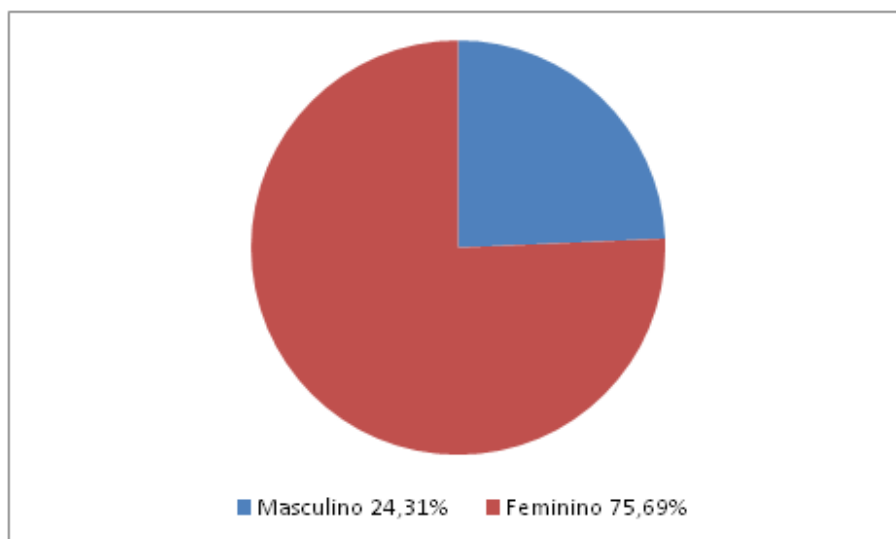
A metodologia RT-PCR utilizando o PCR SuperMix® devidamente padronizada foi aplicada nas amostras respiratórias inclusas nesse estudo para detecção de RSV.

4. RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS

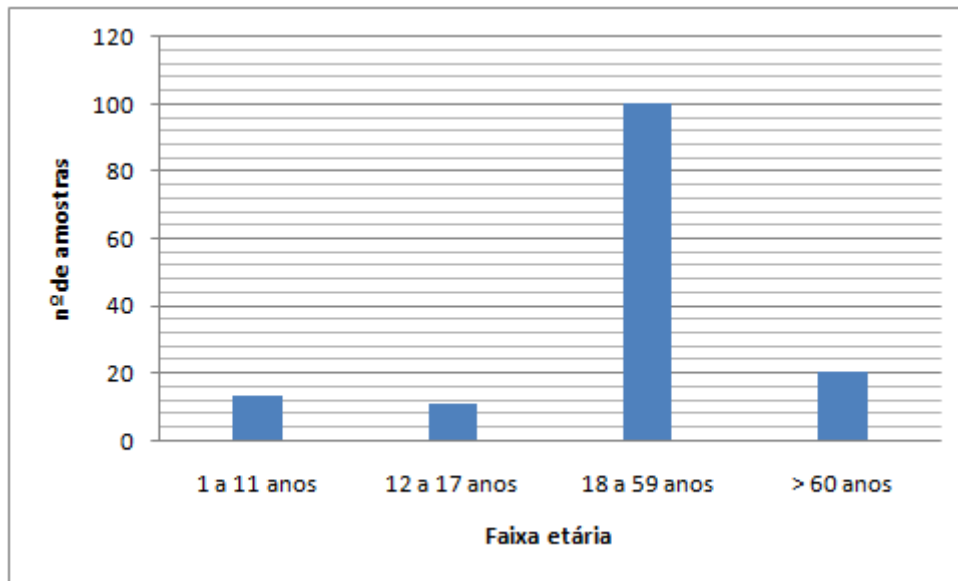
Durante o estudo foram coletadas 144 amostras de secreção nasofaríngea de pacientes com sintomas respiratórios de todas as faixas etárias de idade, provenientes do serviço de atendimento a saúde pública da cidade de Guarapuava-PR. Levando-se em consideração o gênero dos indivíduos participantes do estudo, pode-se dizer que 35 (24,31%) são do gênero masculino e 109 (75,69%) são do gênero feminino. Como demonstrado na figura 3.

Figura 3 – Distribuição entre gênero feminino e gênero masculino dos pacientes incluídos no estudo com (n= 144)



A idade média dos pacientes incluídos no estudo foi de 35,17 anos e a mediana de 31 anos, variando com o mínimo de 1 ano e o máximo de 82 anos de idade. A figura 4 mostra a distribuição conforme a faixa etária, onde pode-se observar que houve um predomínio de pacientes adultos participantes do estudo, de 18 a 59 anos quando comparado a crianças, jovens e idosos.

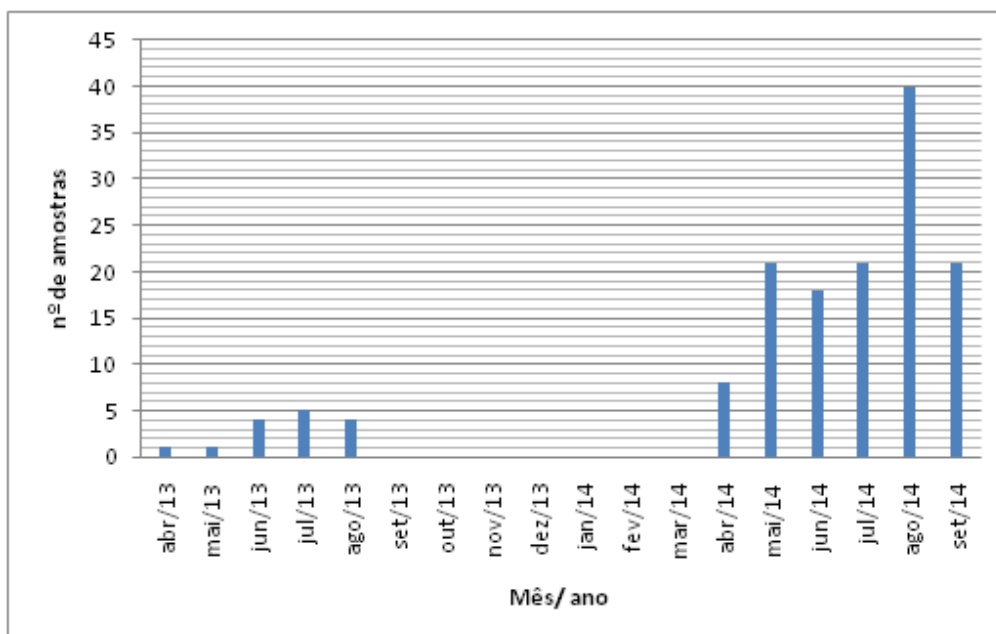
Figura 4 - Distribuição dos pacientes incluídos no estudo por faixa etária



O total de amostras incluídas no estudo foram 144, sendo que 15 foram coletadas de pacientes com sintomas de infecção respiratória atendidos durante o ano de 2013 e 129 durante o ano de 2014.

O número de amostras coletadas de casos suspeitos em cada mês durante os anos de 2013 e 2014 está demonstrado na figura 5. Visto que os meses com maior número de amostras coletadas foi agosto, seguido de maio, julho e setembro do ano de 2014.

Figura 5 - Distribuição mensal das amostras incluídas no estudo

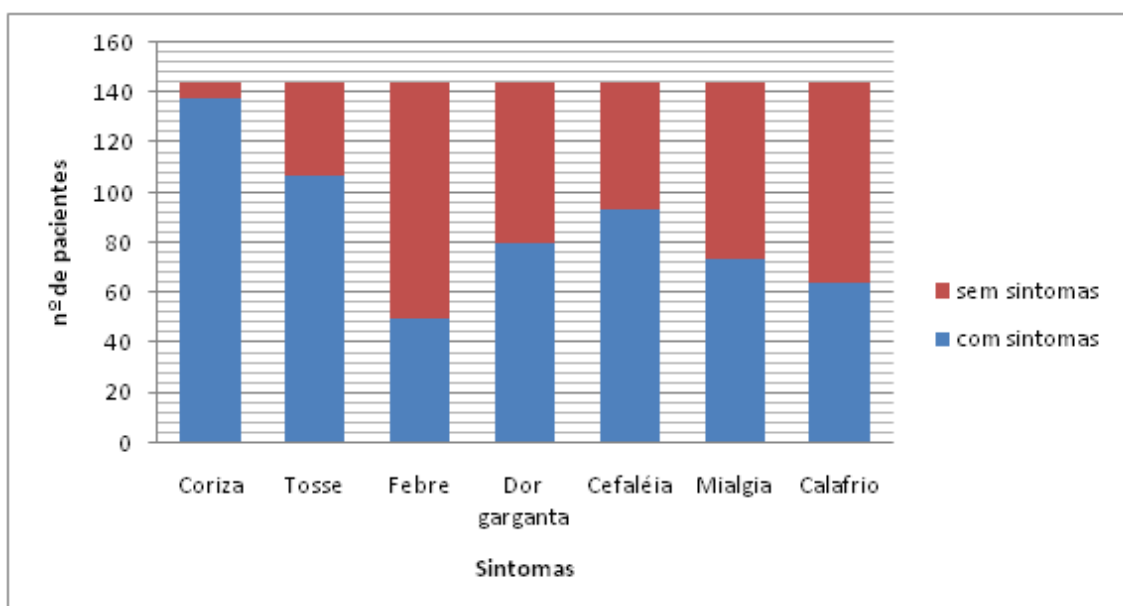


4.2 SINTOMAS

A média de tempo do início dos sintomas respiratórios apresentados pelos pacientes incluídos no estudo foi de 6,46 dias e a mediana de 4 dias, variando com o mínimo de 1 dia e o máximo de 30 dias.

A figura 6 mostra os sintomas apresentados pelos 144 pacientes participantes do estudo, quando questionados sobre a ausência ou a presença de quais sintomas. Podendo-se observar que os sintomas mais característicos da infecção viral aguda nesse estudo foram coriza e tosse.

Figura 6- Ocorrência de sintomas relatados pelos pacientes participantes do estudo



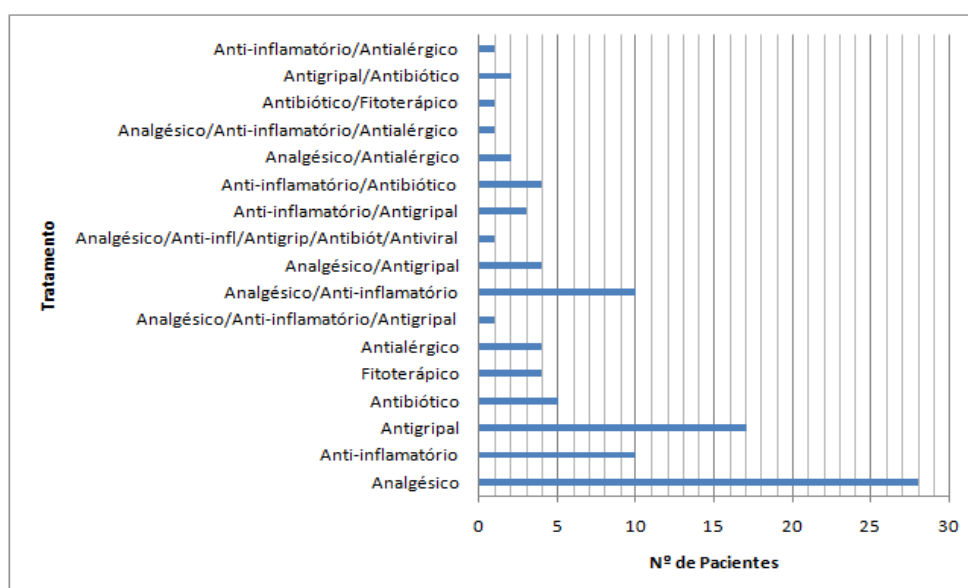
4.3 TRATAMENTO

Os pacientes participantes do estudo foram questionados quanto às terapias farmacológicas utilizados durante os sintomas da infecção respiratória aguda, como demonstrado na tabela 4 e na figura 7.

Tabela 4- Terapias Farmacológicas utilizadas pelos pacientes incluídos no estudo durante a infecção respiratória aguda

TRATAMENTO	NÚMERO	%
Não tratados	46	31,94
Analgésico	28	19,44
Anti-inflamatório	10	6,94
Antigripal	17	11,81
Antibiótico	5	3,47
Fitoterápico	4	2,78
Antialérgico	4	2,78
Analgésico/Anti-inflamatório/Antigripal	1	0,69
Analgésico/Anti-inflamatório	10	6,94
Analgésico/Antigripal	4	2,78
Analgésico/Anti-infl/Antigrip/Antibiót/Antiviral	1	0,69
Anti-inflamatório/Antigripal	3	2,08
Anti-inflamatório/Antibiótico	4	2,78
Analgésico/Antialérgico	2	1,39
Analgésico/Anti-inflamatório/Antialérgico	1	0,69
Antibiótico/Fitoterápico	1	0,69
Antigripal/Antibiótico	2	1,39
Anti-inflamatório/Antialérgico	1	0,69
Total	144	100,00

Figura 7 - Terapias Farmacológicas relatadas pelos pacientes incluídos no estudo



4.4 VACINA

Os pacientes foram questionados quanto à vacinação contra o vírus Influenza H1N1, H3N2 e influenza B, considerando o período de um ano prévio a sua inclusão no estudo. A figura 8 mostra que 46 (31,94%) foram vacinados e 98 (68,06%) dos pacientes não receberam a vacina para os 3 tipos de vírus influenza. A tabela 5 demonstra a vacinação conforme a faixa etária dos pacientes incluídos no estudo.

Figura 8 – Vacinação para os vírus da gripe H1N1, H3N2 e influenza B, nos pacientes incluídos no estudo

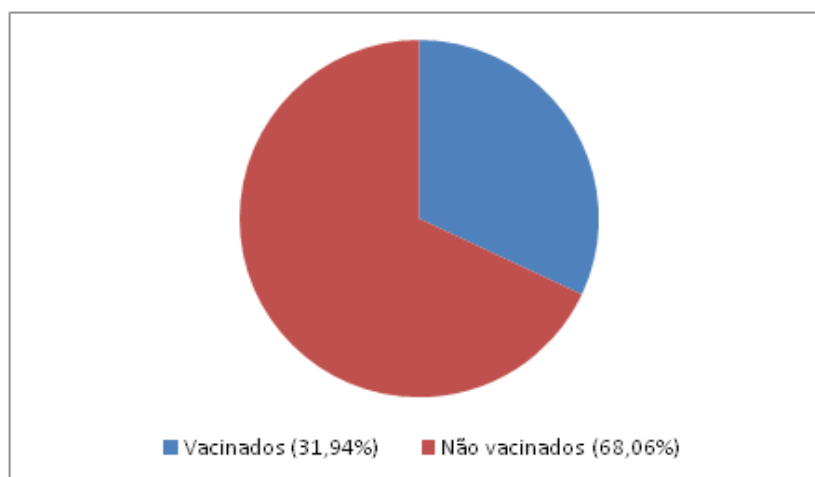


Tabela 5 – Pacientes vacinados e não vacinados inclusos no estudo, de acordo com a faixa etária

Idade	Não vacinadas (n)		Vacinadas	
	N	%	N	%
1 – 11	6	46,16	7	53,84
12 – 17	8	72,73	3	27,27
18 – 59	78	78	22	22,0
> 60	6	30	14	70
Total/média	98	56,72	46	43,27

N – número de indivíduos; média – percentagem média de vacinados

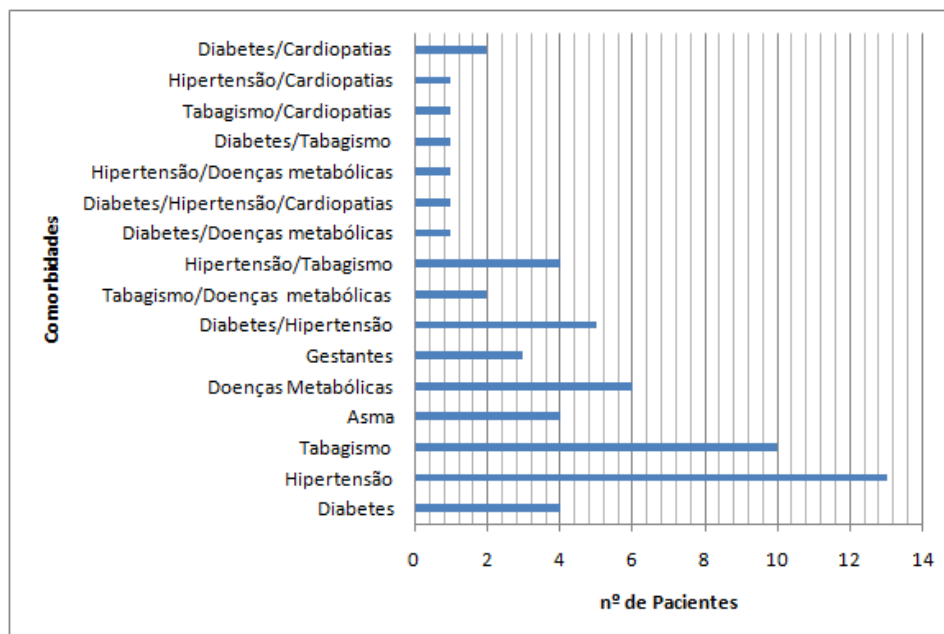
4.5 COMORBIDADES

Foi questionado aos pacientes quanto ao seu estado de saúde, informando se eram indivíduos saudáveis ou apresentavam alguma doença prévia a sua inclusão no estudo, considerada como comorbidade e demonstrado na tabela 6. Em seguida, pode-se observar a distribuição entre as comorbidades relatadas pelos pacientes incluídos no estudo na figura 9.

Tabela 6 - Relato da presença e ausência de comorbidades pelos pacientes incluídos no estudo

COMORBIDADES	NÚMERO	%
Sem comorbidades	85	59,03
Diabetes	4	2,78
Hipertensão	13	9,03
Tabagismo	10	6,94
Asma	4	2,78
Doenças Metabólicas	6	4,17
Gestantes	3	2,08
Diabetes/Hipertensão	5	3,47
Tabagismo/Doenças metabólicas	2	1,39
Hipertensão/Tabagismo	4	2,78
Diabetes/Doenças metabólicas	1	0,69
Diabetes/Hipertensão/Cardiopatias	1	0,69
Hipertensão/Doenças metabólicas	1	0,69
Diabetes/Tabagismo	1	0,69
Tabagismo/Cardiopatias	1	0,69
Hipertensão/Cardiopatias	1	0,69
Diabetes/Cardiopatias	2	1,39
Total	144	100,00

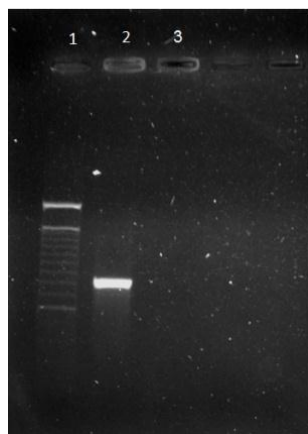
Figura 9 – Números de comorbidades relatada pelos pacientes incluídos no estudo



4.6 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)

A partir do protocolo descrito por (STOCKTON et al., 1998), foram realizadas reações de RT-PCR com variações nas concentrações dos componentes para avaliar o melhor rendimento da reação.

Figura 10- Resultado da amplificação pela RT-PCR da cepa controle de RSV visualizado em gel de agarose a 1,2%

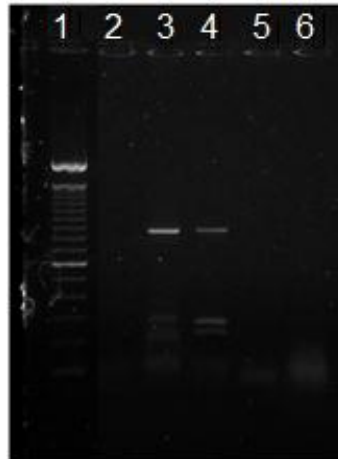


Linha 1- Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, Brasil);
 linha 2- Cepa controle de RSV de 838pb; 3- Controle negativo (água de grau molecular)

4.6.1 LIMITE DE DETECÇÃO

Na figura 11 observamos o resultado do limite de detecção para a cepa controle de RSV, onde podemos observar que a maior diluição de RSV detectada foi 10^{-2} .

Figura 11- Amplificação pela PCR das cepas controles diluídas de RSV

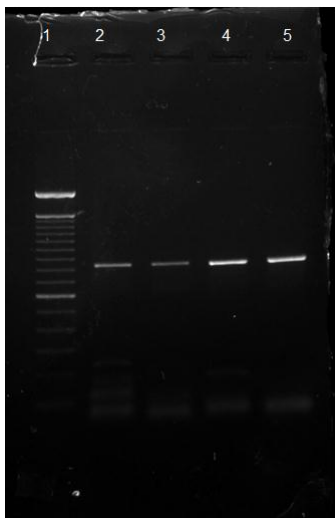


Linha 1- Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, Brasil); linha 2- Controle negativo (água de grau molecular); linha 3- Diluição RSV 10^{-1} ; linha 4- Diluição RSV 10^{-2} , linha 5- diluição RSV 10^{-3} ; linha 6- diluição RSV 10^{-4}

4.6.2 TEMPERATURA DE ANELAMENTO

Dentre as diferentes temperaturas testadas para o anelamento dos primers, a que apresentou melhor resultado foi à temperatura de 54°C .

Figura 12- Amplificação pela RT-PCR nas diferentes temperaturas de anelamento para cepas controles RSV na diluição de 10^{-2}



Linha 1- Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen); 2- Cepa controle de RSV 10^{-2} na temperatura de 52,5°C; 3- Cepa controle de RSV 10^{-2} na temperatura de 52,9°C; 4- Cepa controle de RSV 10^{-2} na temperatura de 54,0°C; 5- Cepa controle de RSV 10^{-2} na temperatura de 55,1°C

4.6.3 VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DO CLORETO DE MAGNÉSIO

A concentração de $MgCl_2$ que apresentou maior rendimento a reação foi de 3,5mM na diluição de RSV (10^{-2}).

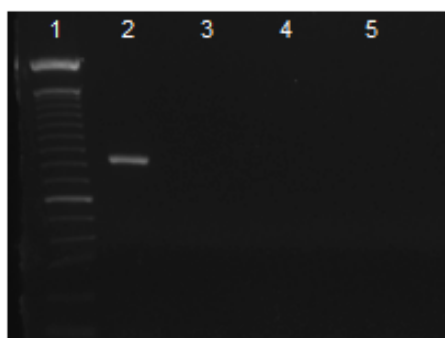
4.6.4 VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA TAQ DNA POLIMERASE

A concentração de enzima que apresentou maior rendimento a reação foi a de 1U/ μ L na diluição de RSV (10^{-2}).

4.6.5 ESPECIFICIDADE ANALÍTICA DOS PRIMERS

O par de primers utilizado na padronização da reação de RT-PCR mostrou-se específicos para o RSV quando testados frente a cepas controles de outro vírus, levando em consideração que não houve a amplificação de outros vírus nos resultados obtidos através de análises em gel de agarose a 1,2% visualizado em transiluminador de luz ultravioleta Alphamager HP (Protein Simple, EUA) utilizando o software Alphaview versão 3.4. como demonstrado na figura 13.

Figura 13- Amplificação pela RT-PCR testado frente a diferentes cepas controles de vírus

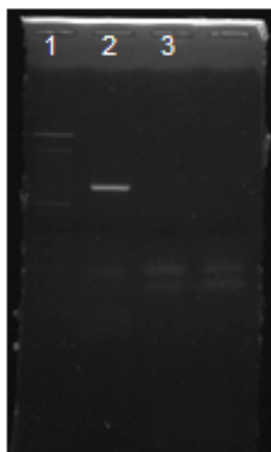


Linha 1- Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen); 2- Cepa controle de RSV de 838pb; 3- Cepa controle de Norovírus GII; 4- Cepa controle de Influenza A (H1N1); 5- Controle negativo (água de grau molecular)

4.7 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO UTILIZANDO REAGENTE PCR SuperMix®

Por uma questão de praticidade, foi avaliada a possibilidade de se realizar a RT-PCR utilizando-se o kit PCR SuperMix®, que é um mix de reagente prontos contendo Mg^{2+} , dNTPs e Taq DNA polymerase recombinante em concentrações suficientes para permitir a amplificação do vírus durante a PCR.

Figura 14- Resultado da amplificação pela RT-PCR da cepa controle de RSV utilizando PCR SuperMix[®], visualizado em gel de agarose a 1,2%



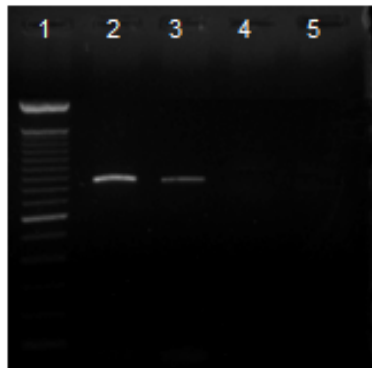
Linha 1- Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen);
linha 2- Cepa controle de RSV de 838pb; 3- Controle negativo (água de grau molecular)

4.7.1 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR) COM PCR SuperMix[®] EM DIFERENTES VOLUMES

Houve a padronização do reagente PCR SuperMix[®] (Invitrogen, Brasil), testando-se diferentes volumes do reagente no produto da transcrição reversa (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION, 2010).

De acordo com a figura 15 podemos observar que o volume padronizado do reagente PCR SuperMix[®] para a detecção da cepa controle de RSV, visualizado em gel de agarose a 1,2%, foi de 10,5 μ L.

Figura 15- Resultado da amplificação pela RT-PCR com diferentes volumes do reagente PCR SuperMix® em cepa controle de RSV visualizado em gel de agarose a 1,2%

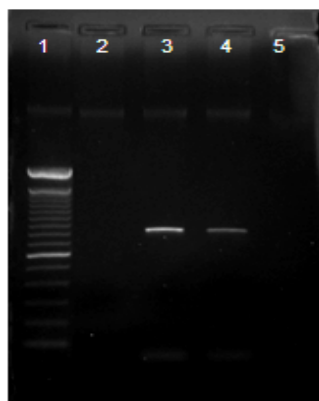


Linha 1- Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen); 2- PCR SuperMix® com volume de 10,5µL para Cepa controle de RSV; 3- PCR SuperMix® com volume de 9,5µL para Cepa controle de RSV; 4- PCR SuperMix® com volume de 8,5µL para Cepa controle de RSV; 5- Controle negativo (água de grau molecular)

4.7.2 LIMITE DE DETECÇÃO

Na figura 16 observamos o resultado do limite de detecção para a cepa controle de RSV utilizando o reagente PCR SuperMix®, onde podemos observar que a maior diluição de RSV detectada nesta reação foi 10^{-2} .

Figura 16- Amplificação da PCR utilizando o reagente PCR SuperMix® em cepas controles diluídas de RSV

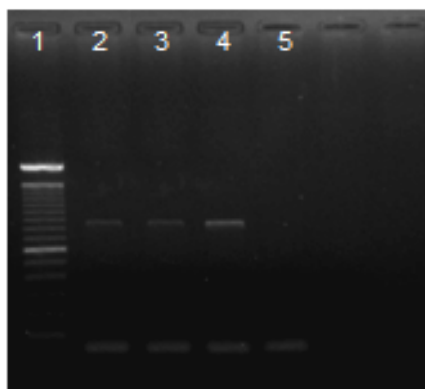


Linha 1- Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen); linha 2- Controle negativo (água de grau molecular); linha 3- Diluição RSV 10^{-1} ; linha 4- Diluição RSV 10^{-2} , linha 5- diluição RSV 10^{-3}

4.7.3 TEMPERATURA DE ANELAMENTO

Dentre as diferentes temperaturas testadas para o anelamento dos primers, a que resultou em maior eficiência da reação foi à temperatura de 54°C na cepa diluída de RSV a 10⁻².

Figura 17- Amplificação pela RT-PCR com PCR SuperMix® de reagentes nas diferentes temperaturas de anelamento para cepas controles RSV na diluição de 10⁻²



Linha 1- Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen); 2- Cepa controle de RSV 10⁻² na temperatura de 52,5°C; 3- Cepa controle de RSV 10⁻² na temperatura de 52,9°C; 4- Cepa controle de RSV 10⁻² na temperatura de 54,0°C; 5- Controle negativo (água de grau molecular)

4.8 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA RT-PCR PARA DETECÇÃO DE RSV NAS AMOSTRAS CLÍNICAS

A metodologia RT-PCR utilizando o reagente PCR SuperMix® devidamente padronizada foi aplicada nas amostras respiratórias inclusas no estudo. No entanto, o resultado das 144 amostras desse estudo apresentaram-se negativas para o RSV, nas figuras 18, 19 e 20 abaixo pode-se observar exemplos destes resultados.

Figura 18- Amplificação pela RT-PCR para detecção de RSV em amostras respiratórias incluídas nesse estudo



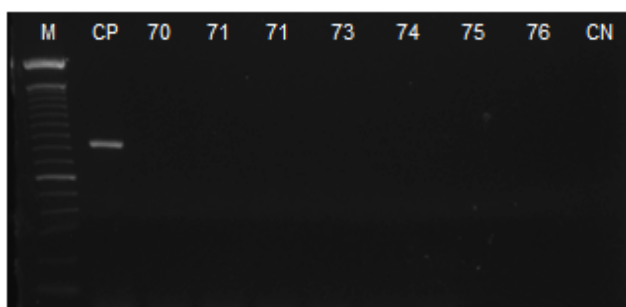
M- Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen); CP- Cepa controle positivo RSV de 838pb; 91- Amostra nº91; 92- Amostra nº92; 93- Amostra nº93; 94- Amostra nº94; 95- Amostra nº95; 96- Amostra nº96; 97- Amostra nº97; CN- Controle negativo (água de grau molecular)

Figura 19- Amplificação pela RT-PCR para detecção de RSV em amostras respiratórias incluídas nesse estudo



M- Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen); CP- Cepa controle positivo RSV de 838pb; 63- Amostra nº63; 64- Amostra nº64; 65- Amostra nº65; 66- Amostra nº66; 67- Amostra nº67; 68- Amostra nº68; 69- Amostra nº69; CN- Controle negativo (água de grau molecular)

Figura 20- Amplificação pela RT-PCR para detecção de RSV em amostras respiratórias incluídas nesse estudo



M- Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen); CP- Cepa controle positivo RSV de 838pb; 70- Amostra nº70; 71- Amostra nº71; 72- Amostra nº72; 73- Amostra nº73; 74- Amostra nº74; 75- Amostra nº75; 76- Amostra nº76; CN- Controle negativo (água de grau molecular)

5. DISCUSSÃO

Sabe-se que o vírus Sincicial Respiratório Humano é um importante agente viral causador de doenças respiratórias graves na população pediátrica e foi reconhecido como uma das principais causas de morbidade em crianças menores de 2 anos de idade (GARDINASSI et al., 2012). No entanto, existe a necessidade de uma análise sistemática mais ampla do impacto da infecção por RSV tanto em crianças como em adultos. O impacto na saúde de infecção por RSV em crianças está muito melhor documentada do que o impacto sobre os adultos, sendo assim, o presente estudo foi realizado em local de atendimento primário de saúde na comunidade da cidade de Guarapuava-Paraná e resultou em investigação de IRAs predominantemente de pacientes adultos jovens.

Em relação à sazonalidade das IRAs, pode-se observar através da figura 5 apresentada nos resultados desse estudo, que os meses nos quais houve um maior número de amostras coletadas foi de abril a setembro nos dois anos avaliados. Estudos mostram que nas regiões tropicais, as epidemias pelo RSV iniciam no outono e vão até a primavera. No Brasil, o RSV predomina nas estações de outono e inverno, particularmente nos meses de abril a agosto/setembro de cada ano (SALOMÃO Jr et al., 2011). Apesar desse estudo incluir um maior número de pacientes justamente nos meses de maior circulação de RSV não houve detecção deste agente. Uma limitação do presente estudo foi a inclusão de pacientes nos meses de abril a setembro somente durante dois anos, visto que um estudo epidemiológico demandaria um tempo maior de coletas e por período de pelo menos 3 anos.

O tempo de início dos sintomas respiratórios apresentados pelos pacientes incluídos no estudo teve como mediana 4 dias, o que caracteriza, de modo geral, os quadros clínicos como de infecção aguda devido ao curto tempo de início dos sintomas (FREITAS et al., 2011). Com base nos resultados obtidos na figura 6, pode-se notar que todos os pacientes apresentaram algum sintoma. Sendo que os mais frequentes foram a coriza com 138 (95,83%) e tosse com 107 (74,31%). Esses resultados estão de acordo com os estudos de BONFIM et al. (2011) mostrando que os sintomas clínicos predominantes na

infecção respiratória de seu estudo foram coriza com (93,2%) e tosse com (58,2%) dos pacientes e PECCHINI et al, 2008 também encontraram como sintomas mais comuns tosse (92,3%) e coriza (64,7%) em pacientes no seu estudo.

Sobre as terapias farmacológicas utilizadas pelos pacientes incluídos no presente estudo para tratar sintomas respiratórios, pode-se perceber que a maioria dos participantes 98 (68,06%) utilizou alguma terapia farmacológica para alívio dos sintomas, sendo que dentre estas terapias as mais frequentes foram os analgésicos. Considerando somente os pacientes medicados desse estudo, o número de pacientes que fez o uso de analgésicos para sintoma de infecção respiratória aguda foi de 28,57% e o número de pacientes que fizeram o uso de analgésicos associados a outros medicamentos foi de 19,38%, totalizando então o uso de analgésico em 47,95% dos pacientes. Concordando com o estudo de BRICKS & LEONE (1996) que dentre os pacientes tratados, fármacos com ação no aparelho respiratório, analgésicos sem associações de outras terapias foram utilizados por 27,8% das crianças.

Deve-se levar em consideração que a dor foi um dos principais sintomas relatados pelos pacientes nesse estudo. E os analgésicos não-opioides são indicados para dores leves ou moderados de natureza tegumentar, localização diversificadas associadas ou não a reação inflamatória periférica. Os analgésicos são medicamentos de uso curto, não devem ser utilizados frequentemente, caso a dor ou os sintomas continuem, é preciso suspender o uso e procurar um médico (RODRIGUES et al., 2011).

A associação de terapias farmacológicas com analgésicos onde houve mais relatos pelos pacientes nesse estudo foi com anti-inflamatórios em 10 (6,94%) dos casos, levando-se em consideração todos os pacientes. O segundo grupo de terapia farmacológica mais utilizada pelos pacientes neste estudo foram os anti-inflamatórios não-esteróides (AINES) com o número de 10 (6,94%) pacientes e anti-inflamatório com associações 21 (14,77%) pacientes, totalizando em 31 (21,71%) dos pacientes. Apresentando resultado semelhante ao estudo de BERQUÓ et al. (2004), no qual 396 pessoas referiram ter tratado uma infecção respiratória, fizeram uso de 492 medicamentos, uma média de 1,2 por pessoa, entre esses medicamentos os anti-inflamatórios não-esteróides foram as drogas mais utilizadas 13,2% de todas as drogas do estudo. A ampla

utilização de anti-inflamatórios não-esteróides nas doenças atribui-se à sua ação, inibindo a síntese de prostaglandinas e propiciando alívio dos principais sintomas associados e comuns às infecções respiratórias, cefaléia, mal estar, mialgia e tosse (BERQUÓ et al., 2004). Os quais foram sintomas bastante comuns relatados pelos pacientes nesse estudo, considerados sintomas gerais, não específicos somente do trato respiratório, como a cefaléia com 93 (64,58%) pacientes, mialgia em 73 (50,69%) e tosse com 107 (74,31%).

O número total de pacientes que fizeram o uso somente de antigripais e antigripais com associações foi de 28 (18,44%) pacientes. Os antigripais combinam várias substâncias ativas. Em geral, podem ser de venda livre (ANVISA, 2003). Embora não existam estudos comprovando, sua recomendação é questionável, por varias razões, como vários princípios ativos associados, tornando o risco de efeitos adversos maior, podem incluir alguma substância contra-indicada para o paciente, correndo o risco de tomá-la sem perceber, possibilidade de sobredosagem, tomar outro medicamento com o mesmo princípio ativo contido no antigripal e a dose de certas substâncias ser inferior à recomendada.

O uso do antibiótico neste estudo foi relatado em 5 (3,47%) casos e com associação a outros medicamentos 8 (5,55%) dos casos, num total de 13 (9,02%) de pacientes fizeram o uso de antibióticos. Deve-se levar em consideração que os antibióticos devem ter prescrição médica e são comprados somente mediante receita média, no entanto, neste estudo não foi questionado ao paciente incluso se a indicação do antibiótico foi realizada mediante algum exame laboratorial que comprovasse a real existência de bactérias. Alguns autores apontam maiores indicações de antibióticos quando comparado a esse estudo, segundo BENGUIGUI (2002) observou-se que a proporção de casos de IRA tratados com antibióticos foi de 40% ou mais em crianças com menos de um ano de idade e de 60% no grupo de um a quatro anos, de acordo com as classificações ou os diagnósticos desses casos estimou-se que em ambos os grupos etários não mais de 20% deveria ter recebido tratamento com antibióticos. Outro estudo de DOMINGO et al. (2014) demonstrou que em pacientes com infecção por RSV como o único agente infeccioso respiratório os antibióticos foram administrados a 24,9% de crianças menores de 18 meses de idade e 46,8% das crianças com mais de 18 meses

de idade. Nos EUA, apenas 9% dos pacientes idosos com comorbidades receberam antibióticos, a sua administração chegou a 43% entre os adultos de alto risco (DOMINGO et al., 2014). O uso abusivo de antibióticos para o tratamento de IRA de etiologia viral é bastante comum, isto se deve a uma multiplicidade de fatores, dentre os quais estão às dificuldades para diferenciar clinicamente infecções de etiologia viral das bacterianas, a falsa crença de que o uso profilático de antibióticos pode evitar a ocorrência de complicações, a pressão dos familiares pela prescrição de antibióticos, expectativas dos pacientes os quais associam infecção à necessidade de uso de antimicrobianos, o desconhecimento sobre os possíveis eventos adversos associados ao uso inadequado de antibióticos, incluindo o impacto sobre o aumento da resistência bacteriana (BRICKS, 2003). Além de aumentar o custo dos tratamentos, o uso indiscriminado de antibioticoterapia tem impacto sobre a microbiota dos indivíduos que os utilizam, favorecendo a emergência de cepas resistentes às drogas mais utilizadas (BERQUÓ et al., 2004). Esse fenômeno requer a continuada síntese de novos antibióticos que possam vencer a resistência apresentada pelas bactérias a antibióticos que antes eram eficazes para seu controle (BENGUIGUI, 2002).

Os medicamentos antivirais foram utilizados por apenas 1 paciente, este associado com analgésico, anti-inflamatório, antigripal e antibiótico, no caso uma paciente gestante e não vacinada. Visto que no estudo haviam 3 gestantes e as outras duas já haviam sido imunizadas contra o vírus da gripe H1N1, H3N2 e influenza B. Uma delas utilizou apenas analgésico para o tratamento e a outra não fez o uso de nenhuma medicação. A infecção pelos vírus da influenza sazonal ou da influenza pandêmica causa um efeito deletério maior nas mulheres grávidas do que na população geral, incluindo um possível maior risco de óbito, esse efeito deletério poderia ser explicado por uma alteração do sistema imune, por hemodiluição ou outros fatores que ocorrem na gestação, destacando-se a importância da vacinação em gestantes (SARACENI et al., 2010). Os fatores que tornam as mulheres grávidas mais suscetíveis a alterações fisiológicas próprias da gestação ocorrem no sistema cardiovascular, imunológico e respiratório, além disso, o terceiro trimestre da gestação é caracterizado pela compressão das estruturas viscerais do útero (o que pode restringir a função respiratória) e hipervolemia, o que diminui a

capacidade de adaptação da hemodinâmica em caso de sepse (LENZI et al., 2012). Baseado nestas modificações causadas pela gravidez, o Centro de Controle de Doença dos EUA (CDC) passou a recomendar maior atenção dos serviços de saúde em relação às gestantes com suspeita de Influenza Pandêmica (H1N1) 2009 não vacinadas, a terapia com antiviral (oseltamivir) nas primeiras 48 horas após o início dos sintomas. Estas recomendações têm como objetivo minimizar as consequências da gripe neste grupo de risco (SARACENI et al., 2010).

Os antialérgicos foram utilizados por 4 (2,78%) dos pacientes e com associação de outros medicamentos 4 (2,78%), totalizando 8 (5,55%) de pacientes usando antialérgicos. Com a chegada do inverno, todo o ano ocorre acréscimo do número de casos de pacientes com problemas respiratórios procurando serviços de saúde. Os sintomas de rinite alérgica frequentemente são confundidos com os de infecções respiratórias, na rinite alérgica ocorrem sintomas como espirros, congestão e corrimento nasal (ROXO JR. et al., 2009). Devido aos sintomas nasais, alguns pacientes participantes desse estudo relataram aos pesquisadores dificuldades em diferenciar crises de rinite alérgica com infecção respiratória aguda de etiologia viral (dado não mostrado), contudo no presente modelo de estudo não foi possível avaliar o desfecho dos casos clínicos para concluir a eficácia das terapias utilizadas.

Os medicamentos fitoterápicos foram utilizados por 4 (2,78%) dos pacientes e 1 (0,69%) dos pacientes utilizou com associação a outro medicamento, totalizando então 5 (3,47%) dos pacientes que utilizaram medicamentos fitoterápicos. Levando-se em consideração a outras terapias farmacológicas os medicamentos fitoterápicos foram pouco utilizados pelos pacientes.

Um aspecto importante a ser considerado no presente estudo é que a terapia utilizada por estes pacientes pode se tratar de automedicação, pois sabe-se que dentre as terapias farmacológicas apresentadas, a única medicação em que há restrição de dispensação com apresentação de receita médica são os antibióticos. Assim, não sabemos de que maneira os pacientes participantes do estudo decidiram pelos seus respectivos tratamentos em relação a outras terapias. No Brasil, estima-se que pelo menos cerca de 35% dos medicamentos são adquiridos por automedicação (AQUINO et al., 2010). A

automedicação inadequada, tal como a prescrição errônea, pode ter como consequência efeitos indesejáveis, enfermidades iatrogênicas e mascaramento de doenças evolutivas, representando, portanto, problema a ser prevenido. Segundo o estudo de ARRAIS et al. (1997), a escolha de medicamentos é baseada principalmente na recomendação de pessoas leigas (51,0%) e também relevante a influência de prescrições anteriores (40,0%). Com relação ao segundo aspecto, é possível que a última visita ao médico 36,0% durante o período da pesquisa tenha influenciado sobremaneira o perfil dos medicamentos escolhidos (ARRAIS et al., 1997).

Nesse estudo foi questionado aos pacientes quanto à vacinação contra o vírus Influenza H1N1, H3N2 e influenza B, demonstrado na figura 8, devido a hipótese de que quando as coberturas vacinais contra a influenza estão adequadas poderia ocorrer um aumento da circulação de outros vírus de tropismo respiratório. Entre os mais frequentemente associados com infecções pulmonares e suas complicações está o vírus sincicial respiratório (DONALISIO et al., 2006), uma vez que o RSV apresenta sazonalidade semelhante ao vírus influenza (CINTRA & REY, 2006). No Brasil, o sistema de vigilância sentinela de quadros respiratórios indicou, além do vírus da influenza A e B (14,7%), uma importante circulação de RSV (26,7%), adenovírus (17%) e parainfluenza (16,3%), entre os anos de 2000 e 2003 (DONALISIO et al., 2006).

Na campanha nacional de vacinação contra Influenza os grupos prioritários a serem vacinados são indivíduos com 60 anos ou mais de idade, serão vacinados os trabalhadores de saúde, os povos indígenas, as crianças na faixa etária de 6 meses a menores de 5 anos de idade (4 anos, 11 meses e 29 dias), as gestantes, as puérperas (até 45 dias após o parto), os grupos portadores de doenças crônicas não transmissíveis e outras condições clínicas especiais (CAMP. NAC. VACINAÇÃO INFLUENZA, 2014). Levando-se em consideração que faixa etária dos pacientes incluídos nesse estudo foi composta majoritariamente de adultos jovens e que a maioria (59,03%) dos pacientes participantes do estudo não apresentavam nenhuma comorbidade este não fazia parte do grupo de população a ser imunizada contra o Influenza. Desse modo pode-se dizer que a quantidade de pacientes vacinados 46 (31,94%) é alta visto que o grupo etário predominante no estudo não é considerado grupo prioritário para vacinação contra os 3 tipos de vírus

influenza.

Quanto as comorbidades apresentadas pelos pacientes incluídos no estudo, conforme demonstrado na figura 9 e na tabela 6, cabe ressaltar que a idade média dos 144 pacientes incluídos no estudo foi de 35,17 anos e a mediana de 31, e dentre esses pacientes 85 (59,03%) não apresentaram nenhuma comorbidade, assim pode-se dizer que é esperado que a maior parte dos pacientes não apresente comorbidades, visto que a grande maioria dos participantes são adultos jovens. Segundo o estudo (ZASLAVSKY & GUS, 2002) atualmente, as comorbidades são uma importante preocupação principalmente em idosos. Dentre as comorbidades questionadas no estudo, a que apresentou maior relato pelos pacientes incluídos no estudo foi a hipertensão com 25 (17,35%) pacientes, nesse estudo a hipertensão atingiu adultos com idade acima de 33 anos, sendo a média de idade entre eles 55,92 anos. Já o número total de pacientes diabéticos foi de 14 (9,71%), exceto um paciente com 15 anos de idade, todos os outros pacientes diabéticos 13 (9,02%) apresentavam idade superior a 41 anos, sendo que a média da idade desses pacientes foi de 59,84 anos de idade. Conforme o Ministério da Saúde, a Hipertensão Arterial e o Diabetes Mellitus são fatores de risco para as doenças respiratórias, doenças cardiovasculares, destacando-se como agravo em saúde pública e sendo causadoras de acidente vascular encefálico e infarto agudo do miocárdio na faixa etária de 30 a 69 anos (ARAÚJO et al., 2007).

Em seguida foram os pacientes fumantes com 18 (12,49%) pacientes participantes do estudo, e a média da idade dos pacientes tabagistas foi de 48,27 anos. O tabagismo atua negativamente sobre as funções pulmonares, e é responsável por aumentar o risco das doenças pulmonares no adulto, sobretudo no idoso, que já sofre com as alterações fisiológicas decorrentes da idade. O fumo leva a uma irritação das vias aéreas que aos poucos evolui para uma alteração completa e irreversível da arquitetura pulmonar, podendo evoluir para uma insuficiência respiratória. As infecções respiratórias agudas causadas por vírus merecem destaque, já que podem ser um fator que leva à pneumonia (GOULART et al., 2010). Já a saúde infantil pode ser prejudicada pela fumaça domiciliar do tabaco, que é o mais comum poluidor do ar doméstico, podendo variar sua concentração de acordo com o número de fumantes do domicílio e do número de cigarros fumados dentro de casa. Apesar da evidência de que o

fumo passivo aumenta a incidência das infecções respiratórias e de já terem sido criadas leis (Lei n. 9.294 de 1996) proibindo o fumo em alguns locais públicos, são elevadas as taxas de exposição de crianças ao tabagismo passivo no Brasil (SILVA et al., 2006).

Dentre os pacientes abordados no estudo, foram descritos 4 (2,78%) asmáticos, com idade média entre eles de 27,75 anos. Esses pacientes são considerados adultos jovens, fazendo parte do grupo de risco nas infecções respiratórias agudas e estão na faixa etária do principal grupo em questão nesse estudo. As exacerbações da asma estão associadas a fatores precipitantes de diversas naturezas. A exposição aos alérgenos inalatórios, principalmente ao mofo, pólen e ácaro da poeira domiciliar; outros fatores precipitantes importantes são a exposição ao frio, uso de drogas, poluição atmosférica e mudanças climáticas. Além disto, as infecções do trato respiratório também têm sido associadas com as crises asmáticas. Alguns estudos mostram que em crianças, a infecção viral aumenta a reatividade das vias aéreas e é responsável por 26% a 42% dos episódios de asma aguda. Em adultos, o papel da infecção viral como causa da exacerbação da asma ainda não está muito bem definida, em estudos recentes, a frequência da identificação de vírus respiratório associado à crise asmática variou de 0% a 44% (ROCHA et al., 2005).

Nos asmáticos, a infecção viral ocasiona um desequilíbrio na homeostase imunológica do sistema respiratório. Vários mecanismos relacionados à infecção viral e à inflamação alérgica, bem como o seu papel no desencadeamento da asma aguda, têm sido propostos, entre eles a deficiência na função da barreira epitelial causada pelos vírus, que tem sido apontada como fator predisponente. Outro fator que tem sido avaliado é a produção de muco como mecanismo de defesa das vias aéreas, tendo sido demonstrado em estudos experimentais que a inflamação alérgica e a infecção viral atuam sinergicamente aumentando a sua produção, o que pode levar à obstrução das vias aéreas em asmáticos (COSTA et al., 2014). Estudos usando a técnica de diagnóstico de PCR têm elevado a frequência de achados de infecções virais em adultos com exacerbação da asma (ROCHA et al., 2005).

O total de pacientes com doenças metabólicas foi de 10 (6,94%) e sua média de idade foi de 49,30 anos; já os pacientes com cardiopatias foram 5

(3,46%) e a média de idade deles foi de 58,60 anos. Essas doenças são fatores de agravamento para doença respiratória bem conhecidos (VRANJAC, 2009; MARTINS et al., 2011), mas que no presente estudo a ausência de detecção viral prejudicou tal análise.

O número total de pacientes gestantes foram apenas 3 (2,08%), estas estão no principal grupo analisado pelo estudo, devido a sua faixa etária, média da idade delas é 32,33 anos. No que diz respeito às gestantes, destaca-se que, durante a gravidez, o corpo da mulher passa por diversas alterações imunológicas, metabólicas, endócrinas e vasculares, essas alterações ocorrem para manter o sistema imunológico materno tolerante aos antígenos paternos de histocompatibilidade maior expressos pelo feto, tornando, assim, a gestação uma estimulação do sistema imunológico, em geral, as mulheres grávidas são grupo de risco para qualquer infecção, até mesmo as respiratórias, porque têm imunidade mais baixa (PEREIRA et al., 2013).

Em relação às metodologias moleculares, essas podem ser empregadas para detecção de RSV com alta sensibilidade e especificidade. Nesse estudo utilizou a técnica de RT-PCR que se tornou amplamente utilizada para tal finalidade através da sua capacidade de detectar pequenas quantidades de cópias de material genético, além de detectar partículas armazenadas por longo período de tempo. Existem estudos que demonstram uma maior capacidade de detecção por RT-PCR para RSV em amostras de secreção nasal. O estudo de REIS et al. (2008) mostrou que 316 amostras de secreção nasofaríngea de crianças com até dois anos de idade foram processadas para detecção do RSV, utilizando três técnicas diferentes, demonstrando que a PCR foi a técnica mais sensível, proporcionando resultados positivos em 35/316 (11,1%) das amostras, seguido por imunofluorescência direta 25/316 (7,9%) e isolamento viral 20/315 (6,3%).

Há uma clara tendência para a utilização de técnicas que permitem o diagnóstico precoce da infecção pelo RSV, o diagnóstico precoce é vantajoso porque permite a implementação de medidas para limitar a propagação do vírus como em hospitais ou casas de repouso, e a implementação precoce da terapia antiviral. No estudo de REIS et al, 2008 o isolamento viral só permitiu o diagnóstico a partir do terceiro dia após a inoculação, tornando esta técnica inadequada para diagnóstico RSV, particularmente em pacientes que se

beneficiariam claramente de intervenção terapêutica precoce. Imunofluorescência (IF), por outro lado, é largamente utilizado para detectar RSV em células epiteliais da nasofaringe porque é mais rápido e menos trabalhoso que o isolamento, no entanto, a técnica IF requer uma amostra rica em células, a perícia na manipulação de um microscópio de imunofluorescência e é menos sensível do que a RT-PCR. A escolha de uma técnica é de extrema importância para o diagnóstico rápido e sensível de RSV (REIS et al., 2008).

No presente estudo, RT-PCR foi a metodologia escolhida para garantir uma detecção viral com alta sensibilidade e especificidade. A RT-PCR funciona muito bem com a maioria dos alvos de RNA, mas geralmente são necessários ajustes nos parâmetros da reação, a fim de melhorar a especificidade e aumentar o rendimento. Segundo CONNEL (2002), não existe um único protocolo que seja adequado para todas as situações, incluindo laboratório, reagentes e recursos humanos, assim para cada nova experiência é necessário realizar a otimização da reação. A otimização da metodologia RT-PCR realizada no estudo, foi fundamentada em protocolos previamente descritos que visou aumentar o rendimento da reação, com a finalidade de garantir o maior limite de detecção em cada reação, realizada através de alterações nas concentrações de $MgCl_2$, enzimas, temperaturas de anelamento dos primers, reagente PCR SuperMix[®] e interpretação dos resultados obtidos através da visualização em eletroforese dos produtos da amplificação sem o aparecimentos de bandas inespecíficas (CONNEL, 2002).

Pequenas variações em qualquer uma das muitas variáveis da reação de RT-PCR podem levar a um efeito pronunciado sobre o perfil do produto da amplificação (CONNEL, 2002). Em relação à padronização do ensaio de RT-PCR foi tentado ao máximo eliminar a possibilidade de ocorrer resultados falsos positivos e falsos negativos durante a otimização da técnica molecular, sempre fazendo o uso de controles positivos e negativos e executando os ensaios através das condutas de boas práticas laboratoriais. Levando-se em consideração que um dos objetivos do trabalho era a padronização da técnica PCR, houve a padronização dos componentes da reação separadamente e a padronização da técnica utilizando o PCR SuperMix[®] de reagentes e pôde-se observar que as duas formas são sensíveis e específicas frente ao controle

positivo e negativo de RSV, sendo assim optou-se pela técnica de PCR utilizando o PCR SuperMix® na tabela 3 de reagentes devido a otimização de tempo e praticidade, visto que foram várias amostras analisadas. Em todos os procedimentos da reação RT-PCR aplicada nas amostras inclusas no estudo foi utilizado um controle positivo e um negativo, para confirmação da técnica na avaliação das amostras analisadas.

Estudos que visem acompanhar o perfil das doenças respiratórias na comunidade são de extrema importância para se detectar o nível de ocorrência, características da doença em diferentes manifestações clínicas, desde quadros leves até suas complicações, além de avaliar a sazonalidade local. No entanto, a grande maioria dos estudos com o RSV são realizados em ambientes hospitalares e poucos estudos avaliam a circulação desse agente etiológico na comunidade. Assim, estudos em âmbito hospitalar frequentemente relatam uma incidência maior de RSV do que os estudos em comunidade, pois o vírus acomete preferencialmente crianças, sendo que nelas a infecção se desenvolve de forma mais grave levando a hospitalização (D'ELIA et al., 2005). A ausência de positividade nas amostras investigadas pode representar uma limitação do estudo relacionada com a inclusão dos pacientes, que não foi sistemática e ocorreu durante um curto período de tempo. Devido a possibilidade de variação sazonal na circulação de RSV seriam recomendados estudos por período mínimo de 3 anos para demonstrarem uma sazonalidade viral mais fidedigna (LEVY et al., 2009).

Este foi o primeiro estudo realizado em atendimento de serviço primário de saúde pública de casos com doenças respiratórias agudas na cidade de Guarapuava- PR, em que foi avaliada a etiologia de RSV, que poderá servir como base para estabelecer estratégias de diagnóstico, prevenção da doença e também para medidas de controle. Porém é necessária a continuidade de estudos sobre este vírus, com um maior número de amostras e por um período mais prolongado de tempo das coletas, podendo assim obter maiores informações sobre a sua etiologia e epidemiologia nessa região, demonstrando assim a determinação da verdadeira importância do RSV nas infecções respiratórias.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados pode-se dizer que foi concluída a padronização e otimização da técnica de RT-PCR para detecção de RSV no laboratório de Virologia e Biologia Molecular da UNICENTRO com êxito. Houve obtenção das amostras de secreção nasal, a coleta e análise de dados dos pacientes inclusos no estudo. No entanto, não foram detectados casos de infecção respiratória por RSV em pacientes com sintomas respiratórios na cidade de Guarapuava- PR, o que prejudicou a descrição dos quadros clínicos, associação de fatores de risco e utilização de medicamentos nos casos infectados.

7. REFERÊNCIAS

ANDERSON, L.J.; DORMITZER, P.R.; NOKES, D.J.; RAPPUOLI, R.; ROCA, A.; GRAHAM, B.S. *Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development*. *Vaccine.*, v.31, n.2, p.209–215, 2013.

ANDRES, S.; BAUER, G.; RODRIGUEZ, S.; NOVALI, L.; MICHELI, D.; FARINA, D. *Internação devido a infecção pelo vírus sincicial respiratório em pacientes menores de 2 anos com doença cardíaca congênita hemodinamicamente significativa*. *J. Pediatr.*, v.88, n.3, p.246-252, 2012.

ALONSO, W.J.; LARANEJIRA, B.J.; PEREIRA, S.R.; FLORENCIO, C.M.G.D.; MORENO, E.C.; MILLER, M.A.; GIGLIO, R.; SCHUCK-PAIM, C.; MOURA, F.E.A. *Comparative Dynamics, Morbidity and Mortality Burden of Pediatric Viral Respiratory Infections in an Equatorial City*. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v.31, n.1, p.9–14, 2012.

AQUINO, D.S.; BARROS, J.A.C.; SILVA, M.D.P. *Self-medication and health academic staff*. *Ciênc. saúde coletiva.*, v.15, n.5, p.2533-2538, 2010.

ALVAREZ, A.E.; MARSON, F.A.L.; BERTUZZO, C.S.; ARNS, C.W.; RIBEIRO, J.D. *Epidemiological and genetic characteristics associated with the severity of acute viral bronchiolitis by respiratory syncytial virus*. *Jornal de Pediatria.*, v.89, n.6, p.531-543, 2013.

ARAÚJO, T.M.E.; F.S.; NASCIMENTO, D.J.C.; COSTA, F.S.R. *Vacina contra Influenza: conhecimentos, atitudes e práticas de idosos em Teresina*. *Rev. bras. Enferm.*, v.60, n.4, p.439-443, 2007.

ARRAIS, P.S.D.; COELHO, H.L.L.; BATISTA, M.C.D.S.; CARVALHO, M.L.; RIGHI, R.E.; ARNAU, J.M. *Perfil da automedicação no Brasil*. *Rev. Saúde Pública.*, v.31, n.1, p.71-77, 1997.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Anvisa retira antigripais do mercado e os reclassifica como "tratamento sintomático da gripe"*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2003/270203.htm>>. Acesso em 10 de agosto de 2014.

BERQUÓ, L.S.; BARROS, A.J.D.; LIMA, R.C.; BERTOLDI, A.D. *Utilização de medicamentos para tratamento de infecções respiratórias na comunidade*. Rev. Saúde Pública., v.38, n.3, p.358-364,2004.

BENIGUI, Y. *As infecções respiratórias agudas na infância como problema de saúde pública*. Bol. Pneumol. Sanit., v.10, n.1, p.13-22, 2002.

BONFIM, C.M.; NOGUEIRA, M.L.; SIMAS, P.V.M.; GARDINASSI, L.G.A.; DURIGON, E.L.; RAHAL, P.; SOUZA, F.P. *Patógenos respiratórios frequentes em casos de infecções do trato respiratório em crianças de creche*. Jornal de Pediatria., v.87, n.5, p.439-444, 2011.

BRICKS, L.F.; LEONE, E.C. *Use of medicines by children attending nursery schools*. Rev. Saúde Pública., v.30, n.6, p. 527-535,1996.

BRICKS, L.F. *Judicious use of medication in children*. J. Pediatr. (Rio J.), v.79, n.1, p.S107-S114, 2003.

CALEGARI, T.; QUEIROZ, D.A.O.; YOKOSAWA, J.; SILVEIRA, H.L.; COSTA, L.F.; OLIVEIRA, T.F.M.; LUIZ, L.N.; OLIVEIRA, R.C.; DINIZ, F.C.; ROSSI, L.M.G.; CARVALHO, C.J.; LIMA, A.C.; MANTESE, O.C. *Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in Midwestern Brazil*. Braz. J. Infect. Dis., v.9, n.2, p.156-161, 2005.

CAMPANHA NACIONAL DE VACINAÇÃO CONTRA A INFLUENZA- *informe técnico*, Brasília, 2014. Disponível em <http://www.sbim.org.br/wp-content/uploads/2014/04/Informe_Campanha_Influenza_-_25_03_2014.pdf>. Acesso em 01 de agosto de 2014.

CANDEIAS J.A. *Isolation of the respiratory syncytial virus from children with acute respiratory infections*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo., v.9, n.1, p.27-30, 1967.

CARVALHO, W.B.; JOHNSTON, C.; FONSECA, M.C. *Bronquiolite aguda, uma revisão atualizada*. Rev. Assoc. Med. Bras., v.53, n.2, p.182-188, 2007.

CHANOCK R.; ROIZMAN B.; 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., v.66, n.3, p.281-90, 1957.

CINTRA, O.A.L.; Rey, L.C. *Segurança, imunogenicidade e eficácia da vacina contra o vírus influenza em crianças*. J. Pediatr. (Rio J.), v.82, n.3, p.s83-s90, 2006.

COSTELLO, H.M.; RAY, W.C.; CHAIWATPONGSAKORN, S.; PEEPLES, M.E. *Targeting RSV with Vaccines and Small Molecule Drugs*. Infect. Disord Drug Targets., v.12, n.2, p.110–128, 2012.

COSTA, L.D.C.; COSTA, P.S.; CAMARGO, P.A.M. *Exacerbação da asma e infecção das vias aéreas: o vírus é o vilão?*. J. Pediatr. (Rio J.), v.90, n.6, p.542-55, 2014.

CONNEL JOE O. *RT-PCR Protocols*. V.193. New Jersey: Humana Press Totowa, 2002.

CUBIE H.A.; WINTER G.F.; LESLIE E.E.; INGLIS J.M. *Rapid detection of respiratory syncytial virus antigens in nasopharyngeal secretions*. J. Virol. Methods., v.27, n.1, p.121-4, 1990.

CURRIE, S.M.; FINDLAY, E.G.; MCHUGH, B.J.; MACKELLAR, A.; MAN, T.; MACMILLAN, D.; WANG, H.; FITCH, P.M.; SCHWARZE, J.; DAVIDSON, D.

The Human Cathelicidin LL-37 Has Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus. PLoS One., v.8, n.8, p.73659, 2013.

D'ELIA, C.; SIQUEIRA, M.M.; PORTES, S.A.; SANT'ANNA, C.C. *Infecções do trato respiratório inferior pelo vírus sincicial respiratório em crianças hospitalizadas menores de um ano de idade.* Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.38, n.1, p.7-10, 2005.

DOMINGO, D.J.; YARZA, E.G.P.; MELERO, J.A.; LUNA, M.S.; AGUILAR, M.D.; BLASCO, A.J.; ALFARO, N.; LÁZARO, P. *Social, economic, and health impact of the respiratory syncytial virus: a systematic search.* BMC Infect. Dis., v.14, n.1, p.544, 2014.

DINIZ, E.M.A.; VIEIRA, R.A.; CECCON, M.E.J.; ISHIDA, M.A.; VAZ, F.A.C. *Incidência de vírus respiratórios em crianças pré-termo externas submetidas à ventilação mecânica.* Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo., v.47, n.1, p.37-44, 2005.

DONALISIO, M.R.; FRANCISCO, P.M.S.B.; LATORRE, M.R.D.O. *Tendência da mortalidade por doenças respiratórias em idosos antes e depois das campanhas de vacinação contra influenza no Estado de São Paulo - 1980 a 2004.* Rev. bras. epidemiol., v.9, n.1, p.32-41, 2006.

FAGHIHLOO, E.; YAVARIAN, J.; JANDAGHI, N.Z.S.; SHADAB, A.; AZAD, T.M. *Genotype circulation pattern of human respiratory syncytial virus in Iran.* Infection, Genetics and Evolution., v.22, p.130–133, 2014.

FERONE, E.A.; BEREZIN; E.N.; DURIGON, G.S.; FINELLI, C.; FELICIO, M.C.C.; STORNI, J.G.; DURIGON, E.L.; OLIVEIRA, D.B.L. *Aspectos clínicos e epidemiológicos relacionados à detecção de adenovírus ou vírus sincicial respiratório em crianças hospitalizadas por doença aguda do trato respiratório inferior.* Jornal de Pediatria., v.90, n.1, p.42-49, 2014.

FREITAS, T.V.S.; ONO, G.; CORRÊA, L.; GOMES, P.S.; GALANTEI, N.Z.; SILVAI, H.T.; CAMARGO, F.A.; PESTANAI, J.O.A.M. *Manifestações clínicas e*

evolução da infecção pelo vírus da influenza A (H1N1) em receptores de transplante renal. J. Bras. Nefrol., v.33, n.2, p.136-141, 2011.

FIGUEIREDO, L.T.M. *Pneumonias virais: aspectos epidemiológicos, clínicos, fisiopatológicos e tratamento.* J. bras. pneumol., v.35, n.9, p.899-906, 2009.

GARDINASSI, L.G.A.; SIMAS, P.V.M.; GOMES, D.E.; BONFIM, C.M.; NOGUEIRA, F.C.; GARCIA, G.R.; CARARETO, C.M.A.; RAHAL, P.; SOUZA, F.P. *Diversity and Adaptation of Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes Circulating in Two Distinct Communities: Public Hospital and Day Care Center.* Viruses., v.4, n.11, p.2432–2447, 2012.

GIUGNO, M.K. *Concentrações de interleucina-2 na secreção nasofaríngea de crianças acometidas de bronquiolite viral aguda pelo vírus sincicial respiratório.* 2000. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria, Rio Grande do Sul, 2000.

GOLDMANN, D.A. *Epidemiology and Prevention of Pediatric Viral Respiratory Infections in Health-Care Institutions.* CDC, Emerging Infectious Diseases., v.7, n.2, p.249-253, 2001.

GOULART, D.; ENGROFF, P.; ELYI, L.S.; SGNAOLIN, V.; SANTOS, E.F.; TERRAI, N.L.; CARLI, G.A. *Smoking in the elderly.* Rev. Bras. Geriatr. Gerontol., v.13, n.2, p.313-320, 2010.

GUPTA, M.R.; KOLLI, D.; GAROFALO, R.P. *Differential response of BDCA-1⁺ and BDCA-3⁺ myeloid dendritic cells to respiratory syncytial virus infection.* Respiratory Research., v.14, n.1, p.71, 2013.

HALL C.B.; DOUGLAS R.G.J.; GEIMAN J.M. *Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus.* J. Infect Dis., v.141, n.1, p.98-102, 1980.

HALL C.B. *Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus.* N. Engl. J. Med., v.344, n.25, p.1917-28, 2001.

HALONEN P.; HERHOLZER J.; ZIEGLER T. *Advances in the diagnosis of respiratory virus infections*. Clin. Diagn. Virol., v.5, n.2-3, p.91-100, 1996.

HALSTEAD D.C.; TODD S.; FRITCH G. *Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus detection*. J. Clin. Microbiol., v.28, n.5, p.1021-5, 1990.

HASSAN, I.; GAINES, K.S.; HOTTEL, W.J.; WISHY, R.M.; MILLER, S.E.; POWERS, L.S.; RUTKOWSKI, D.T.; MONICK, M.M. *The Inositol Requiring Enzyme 1 Inhibits Respiratory Syncytial Virus Replication*. J. Biol. Chem., v.289, p.7537-7546, 2014.

HEMMING V.G. *Viral respiratory diseases in children: classification, etiology, epidemiology, and risk factors*. J. Pediatr., v.124, n.5 Pt 2, p.13-6, 1994.

HIRSH, S.; HINDIYEH, M.; KOLET, L.; REGEV, L.; SHERBANY, H.; YAARY, K.; MENDELSON, E.; MANDELBOIM, M. *Epidemiological Changes of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infections in Israel*. PLoS One., v.9, n.3, p.90515, 2014.

HUANG, G.; YU, D.; MAO, N.; ZHU, Z.; ZHANG, H.; JIANG, Z.; LI, H.; ZHANG, Y.; SHI, J.; ZHANG, S.; WANG, X.; XU, W. *Viral Etiology of Acute Respiratory Infection in Gansu Province, China, 2011*. PLoS One., v.8, n.5, p.64254, 2013.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?codmun=410940>>. Acessado em 20 de out. de 2014.

IPARDES - INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/perfil_municipal/MontaPerfil.php?Municipio=85000&btOk=ok>. Acessado em 10 de out. de 2014.

KOSAKA, I.M.; CARROMEU, C.; DURIGON, E.L.; VENTURA, A.M. *Construction of adenoviral vectors expressing F and G glycoproteins of human respiratory syncytial virus (HRSV)*. Braz. J. Microbiol., v.35, n.1-2, p.167-172, 2004.

LAMARAO, L.M.; RAMOS, F.L.; MELLO, W.A.; SANTOS, M.C.; BARBAGELATA, L.S.; JUSTINO, M.C.A.; SILVA, A.F.; QUARESMA, A.J.P.G.; SILVA, V.B.; BURBANO, R.R.; LINHARES, A.C. *Prevalence and clinical features of respiratory syncytial virus in children hospitalized for community-acquired pneumonia in northern Brazil*. BMC Infect. Dis., v.12, p.119, 2012.

LANGLEY J.M.; LEBLANC J.C.; WANG E.E.; LAW B.J.; MACDONALD N.E.; MITCHELL L.; STEPHENS D.; MCDONALD J.; BOUCHER F.D.; DOBSON S. *Nosocomial respiratory syncytial virus infection in Canadian pediatric hospitals: a Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada Study*. Pediatrics., v.100, n.6, p.943-6, 1997.

LENZI, L.; PONTAROLO, R. *Evaluation of pregnancy as a risk factor in the outcomes of influenza A (H1N1)/2009 in women of childbearing age*. Cad. Saúde Pública., v.28, n.2, p.395-399, 2012.

LEVY, K.; HUBBARD, A.E.; EISENBERG, J.N. *Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis*. International Journal Epidemiology. v.38, n.6, p.1487-1496, 2009.

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION ©2010. PCR SuperMix High Fidelity. Acesso em: 10. Abril, 2015. Disponível em: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pcr_supermix_hifi_man.pdf.

LOURENÇÃO, L.G.; SALOMÃO Jr, J.B.; RAHAL, P.; SOUZA, F.P.; ZANETTA, D.M.T. *Respiratory Syncytial Virus Infections in children*. Pulmão RJ., v.14, n.1, p.59-68, 2005.

MASTRANGELO, P.; HEGELE, R.G. *RSV Fusion: Time for a New Model*. Viruses., v.5, n.3, p.873–885, 2013.

MARTINS, W.A.; RIBEIRO, M.D.; OLIVEIRA, L.B.; BARROS, L.S.N.; JORGE, A.C.S.M.; SANTOS, C.M.; ALMEIDA, D.P.; CABRAL, I.F.; SOUZA, R.T.; FURQUIM, T.A.B. *Vacinação contra influenza e pneumococo na insuficiência cardíaca - uma recomendação pouco aplicada*. Arq. Bras. Cardiol., v.96, n.3, p.240-245, 2011.

MENG, J.; LEE, S.; HOTARD, A.L.; MOORE, M.L. *Refining the Balance of Attenuation and Immunogenicity of Respiratory Syncytial Virus by Targeted Codon Deoptimization of Virulence Genes*. MBio., v.5, n.5, p.01704-14, 2014.

MOURA, F.E.A.; BORGES, L.C.; PORTES, S.A.R.; RAMOS, E.A.G.; SIQUEIRA, M.M. *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., v.98, n.6, p.739-743, 2003.

MORRIS J.A.; BLOUNT R.E.J.; SAVAGE R.E. *Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v.92, n.3, p.544-9, 1956.

MULHOLLAND E.K.; OLINSKY A.; SHANN F.A. *Clinical findings and severity of acute bronchiolitis*. The Lancet., v.335, n.8700, p.1259-61, 1990.

MURRAY, J.; BOTTLE, A.; SHARLAND, M.; MODI, N.; AYLIN, P.; MAJEED, A.; SAXENA, S. *Risk Factors for Hospital Admission with RSV Bronchiolitis in England: A Population-Based Birth Cohort Study*. PLoS One., v.9, n.2, p.89186, 2014.

NASCIMENTO, C.A. *Detecção do vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) pela RT-PCR em tubo único*. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade de

São Paulo (USP). Instituto Butantan. Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia. São Paulo, 2006.

NOAH, J.W.; SEVERSON, W.; CHUNG, D.H.; MOORE, B.; JIA, F.; XU, X.; MADDOX, C.; RASMUSSEN, L.; SOSA, M.I.; TOWER, N.A.; ANANTHAN, S.; WHITE, E.L.; JONSSON, C.; MATHARU, D.S.; GOLDEN, J.E.; PRISINZANO, T.E.; AUBE, J. *A Cell Based HTS Approach for the Discovery of New Inhibitors of RSV*. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program., 2011.

NUNES, I.F.S. *Perfil epidemiológico das infecções causadas por vírus sincicial respiratório em crianças atendidas em hospital de Fortaleza- CE*. 2004. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Departamento de Patologia e Medicina Legal. Programa de pós graduação em microbiologia médica, Fortaleza-CE, 2004.

OGRA P.L. *Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response*. Paediatr. Respir. Rev., v.5, p.119-26, 2004.

OLIVEIRA, T.F.M.; FREITAS, G.R.O.; RIBEIRO, L.Z.G.; YOKOSAWA, J.; SIQUEIRA, M.M.; PORTES, S.A.R.; SILVEIRA, H.L.; CALEGARI, T.; COSTA, L.F.; MANTESE, O.C.; QUEIROZ, D.A.O. *Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.103, n.5, p.417-422, 2008.

PAIVA, T.M.; ISHIDA, M.A.; BENEGA, M.A.; CONSTANTINO, C.R.A.; SILVA, D.B.B.; SANTOS, K.C.O.; OLIVEIRA, M.I.; BARBOSA, H.A.; CARVALHANAS, T.R.M.P.; SCHUCK-PAIM, C.; ALONSO, W.J. *Shift in the timing of respiratory syncytial virus circulation in a subtropical megalopolis: Implications for immunoprophylaxis*. Journal of Medical Virology., v.84, n.11, p.1825–1830, 2012.

PECCHINI, R. *Prevalência de vírus sincicial respiratório em crianças internadas por doença respiratória aguda*. 2008. Dissertação de Mestrado. Pós graduação na Faculdade de ciências médicas da Santa Casa de São Paulo., 2008.

PECCHINI, R.; BEREZIN, E.N.; FELICIO, M.C.C.; PASSOS, S.D.; SOUZA, M.C.O.; LIMA, L.R.A.V.; UEDA, M.; MATSUMOTO, T.K.; DURIGON, E.L. *Incidence and clinical characteristics of the infection by the Respiratory Syncytial Virus in children admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital*. Braz. J. Infect. Dis., v.12, n.6, p.476-479, 2008.

PERDIGÃO, A.C.B. *Caracterização molecular dos vírus sincicial respiratório humano circulantes em Fortaleza-Ceará durante cinco períodos epidêmicos consecutivos (2004-2008)*. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica. Departamento de Patologia e Medicina Legal. Fortaleza, 2009.

PEREIRA, B.F.B.; MARTINS, M.A.S.; BARBOSA, T.L.A.; SILVA, C.S.O.; GOMES, L.M.X.G. *Reasons why pregnant women did not vaccinate against Influenza A H1N1*. Ciênc. saúde coletiva., v.18, n.6, p.1745-1752, 2013.

PINEROS, J.G.; BAQUERO, H.; BASTIDAS, J.; GARCIA, J.; OVALLE, O.; PATINO, C.M.; RESTREPO, J.C. *Respiratory syncytial virus infection as a cause of hospitalization in population under 1 year in Colombia*. *Jornal de Pediatria.*, v.89, n.6, p.544-548, 2013.

REIS, A.D.; FINK, M.C.D.; MACHADO, C.M.; PAZ, J.P.; OLIVEIRA, R.R.; TATENO, A.F.; MACHADO, A.F.; CARDOSO, M.R.; PANNUTI, C.S. *Comparison of direct immunofluorescence, conventional cell culture and polymerase chain reaction techniques for detecting respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates from infants*. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo., v.50, n.1, p.37-40, 2008.

REIS, A.D. *Incidência de doença de vias aéreas pelo vírus sincicial respiratório humano em coorte de recém nascidos do município de São Paulo: comparação de técnicas diagnósticas e caracterização molecular*. 2006. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.

RESCH, B. *Respiratory Syncytial Virus Infection in High-risk Infants – an Update on Palivizumab Prophylaxis*. J. Open Microbiol., v.8, p.71–77, 2014.

RICETTO, A.G.L.; SILVA, L.H.A.; SPILKI, F.R.; MORCILLO, A.M.; ARNS, C.W.; BARACAT, E.C.E. *Genotypes and clinical data of respiratory syncytial virus and metapneumovirus in brazilian infants: a new perspective*. Braz. J. Infect Dis., v.13, n.1, p.35-39, 2009.

RIGTER, A.; WIDJAJA, I.; VERSANTVOORT, H.; COENJAERTS, F.E.J.; ROOSMALEN, M.V.; LEENHOUTS, K.; ROTTIER, P.J.M.; HAIJEMA, B.J.; HAAN, C.A.M.A. *Protective and Safe Intranasal RSV Vaccine Based on a Recombinant Prefusion-Like Form of the F Protein Bound to Bacterium-Like Particles*. PLoS One., v.8, n.8, p.71072, 2013.

RODRIGUES, O.G.; ROZOV, T.; SILVA, E.M.K.; KOPELMAN, B.I. *Viral etiology in children with acute respiratory disease treated at a University Primary Care Center, in Belém, Pará, Brazil*. Pediatría (São Paulo), v.26, n.1, p.13-20, 2004.

ROCHA, I.T.M.; MENEGOTTO, D.; HOFFMANN, C.F.; BARRETO, S.S.M.; DALCIN, P.T.R.; STRALIOTTO, S.M.; KANG, S.H.; PASIN, L.R.; FISCHER, J.; NIETO, F. *Incidência de infecção viral do trato respiratório em asma aguda atendida em sala de emergência*. J. bras. pneumol., v.31, n.5, p.382-389, 2005.

RODRIGUES, A.R.Q.; UGA, C.E.; JARDIM, J.S.; GARCIA, N.F. *Estudo sobre automedicação no uso de analgésicos na cidade de Aparecida Taboado- MG*. Fundação educacional de Fernandópolis, 2011.

ROXO JR, P.; CARVALHO, B.T.C.; TAVARES, F.S. *Infecções de repetição: o que é importante para o pediatra*. Rev. Paul. pediatr., v.27, n.4, p.430-435, 2009.

SALOMÃO Jr, J.B.; GARDINASSI, L.G.A.; SIMAS, P.V.M.; BITTAR, C.O.; SOUZA, F.P.; RAHAL, P.; ZANETTA, D.M.T. *Vírus respiratório sincicial humano em crianças hospitalizadas por infecções agudas das vias aéreas inferiores*. J. Pediatr., v.87, n.3, p.219-224, 2011.

SARACENI, V.; NICOLAI, C.C.A.; TOSCHI, W.D.M.; CARIDADE, M.C.; AZEVEDO, M.B.; ROCHA, P.M.M.; SILVA, R.L. *Outcomes of Pandemic Influenza (H1N1) 2009 in women of childbearing age, in the City of Rio de Janeiro*. Epidemiol. Serv. Saúde., v.19, n.4, p.339-346, 2010.

SAVY, VILMA; BAUMEISTER, ELSA; BORI, FRANCISCO; SHIROMA, MARCELO; CAMPOS, ANA. *Evaluacion etiologica y clinica de infecciones respiratorias agudas bajas en unapoblacion infantil/ Etiological and clinical evaluation of low acute respiratory infections in children*. Medicina (B.Aires)., v.56, n.3, p.213-7, 1996.

SCHEPENS, B.; SEDEYN, K.; GINSTE, L.V.; BAETS, S.; SCHOTSAERT, M.; ROOSE, K.; HOUSPIE, L.; RANST, M.V.; GILBERT, B.; ROOIJEN, N.V.; FIERS, W.; PIEDRA, P.; SAELENS, X. *Protection and mechanism of action of a novel human respiratory syncytial virus vaccine candidate based on the extracellular domain of small hydrophobic protein*. EMBO Molecular Medicine., v.6, n.11, p.1359–1507, 2014.

SIQUEIRA M.M.; NASCIMENTO J.P.; PORTES S.A.; SCHUY W. *Enzyme immunoassay for respiratory syncytial virus: rapid detection in nasopharyngeal secretions and evaluation of isolates representing different RSV subgroups*. J. Clin. Lab. Anal., v.7, n.2, p.130-3, 1993.

SILVA, R.M.V.G.; VALENTE, J.G.; SANTOS, M.G.F.L.; SICHIERI, R. *Household smoking and respiratory disease in under-five children*. Cad. Saúde Pública., v.22, n.3, p.579-586, 2006.

STOCKTON J.; ELLIS J.S.; SAVILLE M.; CLEWLEY J.P.; ZAMBON M.C. *Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses*. J. Clin. Microbiol., v.36, n.10, p.2990-5, 1998.

SULLENDER, W.M. *Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity*. Clin. Microbiol. Rev., v.13, n.1, p.1–15, 2000.

TABATABAI, J.; PRIFERT, C.; PFEIL, J.; GRULICH-HENN, J.; SCHNITZLER, P. *Novel Respiratory Syncytial Virus (RSV) Genotype ON1 Predominates in Germany during Winter Season 2012–13*. PLoS One., v.9, n.10, p.109191, 2014.

THORBURN K.; KERR S.; TAYLOR N.; VAN SAENE H.K. *RSV outbreak in a paediatric intensive care unit*. J. Hosp. Infect., v.57, n.3, p.194-201, 2004.

VRANJAC, A. *Influenza A/H1N1: atualização*. BEPA, Bol. Epidemiol. Paul., v.6, n.69, p.19-28, 2009.

VIEIRA, R.A.; DINIZ, E.M.A.; CECCON, M.E.J.R. *Correlação entre mediadores inflamatórios na secreção nasofaríngea e no soro de crianças com infecção do trato respiratório inferior por vírus sincicial respiratório e a gravidade da doença*. J. bras. pneumol., v.36, n.1, p.59-66, 2010.

ZASLAVSKY, C.; GUS, I. Idoso. *Doença Cardíaca e Comorbidades*. Arq. Bras. Cardiol., v.79, n.6, p.635-639, 2002.

ZOMER-KOOIJKER, K.; ENT, C.K.V.D.; ERMERS, M.J.J.; UITERWAAL, C.S.P.M.; ROVERS, M.M.; BONT, L.J. *Increased Risk of Wheeze and Decreased Lung Function after Respiratory Syncytial Virus Infection*. PLoS One., n.9, v.1, p.87162, 2014.

WHO- World Health Organization. *Generic protocol to examine the incidence of lower respiratory syncytial virus in children less than five years of age*. Department of vaccines e biologicals, 2000.

WAGNER, M.V. Características hidroclimáticas para a cultura do milho em Guarapuava-pr. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Programa de Pós Graduação em Agronomia. concentração em Produção Vegetal. Guarapuava-PR, 2009.

ANEXO

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você esta sendo convidado (a) a participar de um estudo que tem por objetivo investigar a etiologia e detecção da infecção por doenças respiratórias realizado nos serviços de assistência primária a saúde da rede de pública no município de Guarapuava, PR.

Para a sua participação, deverá autorizar que a amostra de secreção nasal coletada seja utilizada para a detecção de Vírus Sincicial respiratório, também para a genotipagem desse vírus e responder a um questionário sobre avaliação de aspectos clínicos e demográficos. Se concordar em participar, garantimos sigilo das informações e o não aparecimento do seu nome. Sua participação é voluntária, o Sr (a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. O Sr (a) tem liberdade de participar do estudo ou desistir a qualquer momento. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade ou saúde, isto é não envolve riscos diretos ao Sr (a). Os resultados deste estudo serão utilizados e divulgados em eventos científicos, nos quais pesquisadores se comprometem a divulgar os resultados obtidos.

Pesquisadores responsáveis: Emerson Carraro e Fernanda Carolina Pedrosa

Email: emersoncarraro@bol.com.br

Laboratório de Virologia - UNICENTRO

Fone: 36298137, Horário de atendimento: 8:00 às 11:00 e das 13:30 às 17:30.

Eu _____ declaro que estou dispondo-me a conceder esta entrevista, li o termo acima e entendi o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. Entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta afete meu trabalho e autorizo voluntariamente a utilização do material clínico de meu dependente _____ nas atividades da pesquisa.

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do responsável

Guarapuava, _____ de _____ de 2012.

ANEXO 2

QUESTIONÁRIO CLÍNICO APLICADO AOS PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO

NÚMERO DA AMOSTRA _____

DATA DA COLETA: ___/___/_____.

LOCAL DA COLETA: _____

Nome do Paciente: _____

Idade (anos): _____ Sexo: Feminino () Masculino ()

Telefone: _____

Quantas pessoas moram na residência: _____

Quantos sintomáticos: _____. Crianças <5 anos: SIM () NÃO ()

SINTOMAS

Início dos sintomas: _____ dias

Sintomas respiratórios: Tosse () Coriza () Dor de garganta ()

Sintomas gerais: Cefaléia () Mialgia () Calafrios ()

DOENÇAS DE BASE E OUTROS

Cardiopatía ()

Diabetes ()

Hipertensão ()

Tabagismo ()

Asma ()

Doenças Metabólicas ()

Gestação ()

VACINA INFLUENZA: SIM () NÃO ()

Medicamentos utilizados pelos pacientes:
