

# Investigação da ocorrência de infecção respiratória aguda causada pelo vírus sincicial respiratório (RSV) pela técnica da PCR

## Occurrence investigation of acute respiratory infection caused by respiratory syncytial virus (RSV) using the PCR technique

Fernanda Carolina Pedrosa<sup>1</sup>

### Resumo

**Objetivo:** O Vírus Sincicial Respiratório (RSV) é um dos principais agentes virais causadores de infecções graves do trato respiratório em lactentes e crianças. **Métodos:** Investigou-se a ocorrência da infecção respiratória aguda causada pelo RSV em pacientes sintomáticos nos atendimentos de serviço de assistência primária à saúde pública na cidade de Guarapuava, PR. Foram coletadas 144 amostras de secreção nasal dos pacientes incluídos de todas as faixas etárias, entre o ano de 2013 e 2014. **Resultados:** A idade média dos pacientes do 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. **Conclusão:** Foram concluídas as análises de dados dos pacientes e padronizações da metodologia RT-PCR através de cepas controles de RSV. 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.

### Palavras-chave

Vacinas; Vírus Sinciciais Respiratórios; PCR

## INTRODUÇÃO

O RSV é considerado um dos principais agentes virais causadores de infecções graves do trato respiratório em lactentes e crianças no mundo todo. A infecção por RSV resulta em vários sintomas, que vão desde gripais comuns até mais graves, como a bronquiolite e pneumonia.<sup>(1)</sup>

A bronquiolite é a complicação clínica mais comum causada pelo RSV e está associada a eventos respiratórios mais graves.<sup>(2)</sup> Pessoas de todas as faixas etárias podem ser infectadas pelo RSV.<sup>(3)</sup>

A transmissão por RSV ocorre por contato direto através de secreção respiratória e em aerossóis contaminados.<sup>(4)</sup> A transmissão em hospitais pediátricos deve ser controlada, principalmente em crianças com fatores de risco para doença grave.<sup>(5,6)</sup> A propagação do vírus é favorecida também em ambientes fechados, como creches ou escolas.<sup>(7,8)</sup>

As manifestações clínicas das infecções respiratórias causadas por RSV são dependentes da idade do indivíduo e de uma exposição prévia do vírus.<sup>(9)</sup>

O vírus sincicial respiratório (RSV) está classificado no gênero *Pneumovirus*, da ordem *Mononegavirales*, da família *Paramyxoviridae* e subfamília *Pneumovirinae*, fita simples, contendo 15.222 nucleotídeos.<sup>(1,10)</sup> O RSV tem um genoma viral com 10 genes de RNA mensageiro (mRNA) que codificam 11 proteínas.<sup>(11)</sup> Isolados de RSV são divididos em dois grupos de características antigênicas e genéticas: A e B.<sup>(10)</sup>

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.<sup>(12)</sup>

Há aproximadamente 160 mil mortes causadas por RSV no mundo a cada ano, principalmente no mundo em desenvolvimento, onde o acesso aos cuidados de apoio à saúde é limitado.<sup>(13)</sup>

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,<sup>(14)</sup> causando, pelo menos, 66 mil a 199 mil mortes de

<sup>1</sup>Farmacêutica. Mestre em ciências farmacêuticas – Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro) – Guarapuava, PR, Brasil.

Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro) – Guarapuava, PR, Brasil.  
Suporte Financeiro: Fundação Araucária

Artigo recebido em 17/05/2016  
Artigo aprovado em 05/09/2016  
DOI: 10.21877/2448-3877.201600509

crianças menores de 5 anos de idade no mundo todo devido a complicações.<sup>(14)</sup>

No Brasil, um estudo de Alvarez et al., com 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 de ventilação e 0,2% foram a óbito.<sup>(15)</sup>

Na cidade de São Paulo, um estudo prospectivo de Calegari et al. 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.<sup>(4)</sup>

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. No Brasil, o RSV predomina particularmente nos meses de abril a agosto/setembro de cada ano.<sup>(16)</sup>

A reação em cadeia da polymerase (PCR) tem se tornado um teste muito utilizado, pois proporciona uma elevada sensibilidade e especificidade.<sup>(17)</sup> A transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polymerase (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.<sup>(17)</sup> 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, podem detectar e subtipar conjuntamente diferentes vírus em uma mesma amostra clínica coletada de paciente com suspeita de infecção respiratória.<sup>(18)</sup>

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.<sup>(19)</sup>

O objetivo deste estudo foi a 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 e descrever a apresentação clínica e possíveis fatores de risco dos pacientes com infecção respiratória aguda.

## MATERIAL E MÉTODOS

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

pio de Guarapuava, Paraná. A inclusão dos indivíduos no estudo ocorreu a partir do contato com pacientes que se dirigiram com sintomas de gripe ou resfriado ao posto de saúde 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, havendo a procura de pacientes durante o ano todo pelos pesquisadores. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Unicentro (156852/2013).

Cada paciente incluído no estudo teve uma amostra de secreção nasal coletada através da inserção de um *swab* rayon estéril, cerca de 2 cm a 3 cm, em uma das narinas, fazendo movimentos circulares. Após esse procedimento, as amostras frescas foram acondicionadas em um tubo falcon estéril contendo solução fisiológica a 0,9% e devidamente identificadas. 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 1 500 µL e armazenadas sob congelamento a -70°C até o momento da extração do ácido nucleico. Amostras de cepas controles de RSV foram cedidas do Laboratório de Virologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).

A extração foi realizada utilizando-se 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.

Para cada amostra foi gerado o cDNA (ácido desoxirribonucleico complementar) pela mistura de 10 µL de RNA extraído das amostras respiratórias e 1 µL da solução do iniciador randômico a 200 ng/µL (Random Primer, Invitrogen, EUA), colocado em um microtubo de 200 µL e aquecido a 80°C por dez minutos, com posterior resfriamento a 4°C, por cinco minutos. Logo após, foi adicionado à mistura de reagentes para a transcrição reversa, constituída por água de grau molecular (equipamento MiliQ, Millipore, EUA), MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, EUA), tampão concentrado cinco vezes (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 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 25 µL. Após a homogeneização, a síntese do cDNA foi realizada em termociclador Multigene TC 9600G (Labnet Laboratory, EUA) a 42°C durante 60 minutos, seguida 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 200 µL.

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 1.203 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.<sup>(18)</sup>

Foram utilizados, para a reação de amplificação, 5 µL de cDNA e 20 µL da mistura de reagentes, contendo cada reagente devidamente padronizado; dentre eles estão a água de grau molecular (obtida de filtro MiliQ-Millipore, EUA), MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, EUA), tampão para esta reação concentrado dez vezes (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), *primers forward* e *reverse*, enzima Taq DNA polymerase recombinante (Invitrogen, EUA), com volume final da reação de 25 µL.

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

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 Mg<sup>2+</sup>, dNTPs e Taq DNA polymerase recombinante em concentrações suficientes para permitir a amplificação do vírus durante a PCR.

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

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

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,2%, diluído em tam-

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

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

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

Foram realizados diluições das cepas controles antes da extração de ácido nucleico: 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup> para obtenção do parâmetro do limite de detecção. Esta análise foi realizada pela intensidade do brilho das bandas de 838 pares de base, sem a observação de bandas inespecíficas.

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. Concentrações de MgCl<sub>2</sub> também foram testadas: 3,0 mM; 3,5 mM e 4,0 mM na diluição de RSV a 10<sup>-2</sup> para RT-PCR. A enzima Taq DNA polimerase foi testada nas concentrações finais de 1 U/µL; 2 U/µL e 3 U/µL com RSV na diluição (10<sup>-2</sup>) na tentativa de melhorar o rendimento na reação.

Os iniciadores *forward*- GTCTTACAGCCGTGATTAGG e *reverse* GGGCTTTCTTTGGTACTTC foram testados para cepas controles de vírus Influenza e Rinovírus cedidas gentilmente pelo laboratório da UNIFESP em São Paulo.

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

## RESULTADOS

Durante o estudo foram coletadas 144 amostras de secreção nasofaríngea de pacientes com sintomas respira-

tórios de todas as faixas etárias de idade, provenientes do serviço de atendimento à 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%) eram do sexo masculino e 109 (75,69%) do feminino.

A idade média dos pacientes incluídos no estudo foi de 35,17 anos e a mediana de 31 anos, variando com o mínimo de um ano e o máximo de 82 anos de idade. Houve predomínio de pacientes adultos participantes do estudo, de 18 a 59 anos, quando comparado a crianças, jovens e idosos.

O total de amostras incluídas no estudo foi de 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. Meses com maior número de amostras coletadas foi agosto, seguido de maio, julho e setembro do ano de 2014.

A média de tempo do início dos sintomas respiratórios apresentados pelos pacientes incluídos no estudo foi de 6,46 dias e a mediana de quatro dias, variando com o mínimo de um dia e o máximo de trinta dias. Sintomas mais característicos da infecção viral aguda nesse estudo foram coriza e tosse.

Os pacientes foram questionados quanto à vacinação contra o vírus Influenza H1N1, H3N2 e Influenza B, considerando o período de um ano prévio à sua inclusão no estudo. Quarenta e seis (31,94%) foram vacinados e 98 (68,06%) pacientes não receberam a vacina para os três tipos do vírus Influenza.

O resultado do limite de detecção para a cepa controle de RSV, onde a maior diluição de RSV detectada foi  $10^{-2}$ . Dentre as diferentes temperaturas testadas para o anelamento dos *primers*, a que apresentou melhor resultado foi à temperatura de 54°C. A concentração de  $MgCl_2$  que apresentou maior rendimento a reação foi de 3,5 mM na diluição de RSV ( $10^{-2}$ ).

A concentração de enzima que apresentou maior rendimento a reação foi a de 1 U/ $\mu$ L na diluição de RSV ( $10^{-2}$ ). O par de *primers* utilizado na padronização da reação de RT-PCR mostrou-se específico para o RSV quando testado frente a cepas controles de outro vírus, levando em consideração que não houve a amplificação de outros vírus nos resultados obtidos por meio de análises em gel de agarose a 1,2% visualizado em transiluminador de luz ultravioleta Alphamager HP (Protein Simple, EUA) utilizando-se o *software* Alphaview versão 3.4.

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.

Houve a padronização do reagente PCR SuperMix® (Invitrogen, Brasil), testando-se diferentes volumes do reagente no produto da transcrição reversa (Life Technologies Corporation, 2010). 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  $\mu$ L.

No resultado do limite de detecção para a cepa controle de RSV utilizou-se o reagente PCR SuperMix®, onde podemos observar que a maior diluição de RSV detectada nesta reação foi  $10^{-2}$ .

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  $10^{-2}$ .

A metodologia RT-PCR utilizando o reagente PCR SuperMix® devidamente padronizada foi aplicada nas amostras respiratórias incluídas no estudo. No entanto, o resultado das 144 amostras desse estudo apresentaram-se negativas para o RSV.

## DISCUSSÃO

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 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.<sup>(20)</sup> 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 três anos.

O tempo de início dos sintomas respiratórios apresentados pelos pacientes incluídos no estudo teve como mediana quatro dias, o que caracteriza, de modo geral, os quadros clínicos, como de infecção aguda, devido ao curto tempo de início dos sintomas,<sup>(21)</sup> 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 Pecchini et al.,<sup>(22)</sup> mostrando que os sintomas clínicos predominantes na infecção respiratória de seu estudo foram coriza com 93,2% e tosse com 58,2% dos pacientes.

Nesse estudo foi questionado aos pacientes quanto à vacinação contra o vírus Influenza H1N1, H3N2 e Influenza B, 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. 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.<sup>(23)</sup> 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 três tipos de vírus Influenza.

Nesse estudo utilizou-se a técnica de RT-PCR, que se tornou amplamente utilizada para tal finalidade pela 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.<sup>(17)</sup> mostrou que 316 amostras de secreção nasofaríngea de crianças com até 2 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. A escolha de uma técnica é de extrema importância para o diagnóstico rápido e sensível de RSV.<sup>(17)</sup>

No presente estudo, a RT-PCR foi a metodologia escolhida para garantir uma detecção viral com alta sensibilidade e especificidade. 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,<sup>(24)</sup> 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, a qual visou aumentar o rendimento da reação com a finalidade de garantir o maior limite de detecção em cada reação realizada por meio de alterações nas concentrações de  $MgCl_2$ , enzimas, temperaturas de anelamento dos *primers*, reagente PCR SuperMix® e interpretação dos resultados obtidos pela

visualização em eletroforese dos produtos da amplificação sem o aparecimento de bandas inespecíficas.<sup>(24)</sup>

Houve a padronização dos componentes da reação separadamente e na padronização da técnica utilizando o PCR SuperMix® de reagentes 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-se o PCR SuperMix® de reagentes devido à otimização de tempo e praticidade, visto que foram várias amostras analisadas. Em todos os procedimentos da reação RT-PCR aplicada nas amostras incluídas no estudo foi utilizado um controle positivo e um negativo, para confirmação da técnica na avaliação das amostras analisadas.

A grande maioria dos estudos com o RSV é realizada em ambientes hospitalares e poucos estudos avaliam a circulação desse agente etiológico na comunidade.<sup>(25)</sup> 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 à possibilidade de variação sazonal na circulação de RSV seriam recomendados estudos por período mínimo de três anos para demonstrarem uma sazonalidade viral mais fidedigna.<sup>(26)</sup>

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, no qual 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-se obter maiores informações sobre a sua etiologia e epidemiologia nessa região, demonstrando assim a determinação da verdadeira importância do RSV nas infecções respiratórias.

## CONCLUSÃO

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. No entanto, não foram detectados casos de infecção respiratória por RSV em pacientes com sintomas respiratórios na cidade de Guarapuava, PR.

### Abstract

**Objective:** Respiratory syncytial virus (RSV) is one of the main viral agents causing serious respiratory tract infections in infants and children. **Methods:** Investigated 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, PR. One hundred and forty four were collected samples of nasal secretion, included patients of all age

groups, between the year of 2013 and 2014. **Results:** In the results the average age of patients 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. **Conclusion:** Data analyses were completed of patients and standardization of RT-PCR methodology through controls of RSV strains. Standard RT-PCR methodology was applied in the samples, however, were not detected cases of respiratory infection by RSV in patients with respiratory symptoms in the city of Guarapuava, PR.

#### Keywords

Vaccines; Respiratory Syncytial Virus; PCR

## REFERÊNCIAS

- Gardinassi LG, Simas PV, Gomes DE, do Bonfim CM, Nogueira FC, Garcia GR, et al. Diversity and adaptation of human respiratory syncytial virus genotypes circulating in two distinct communities: public hospital and day care center. *Viruses*. 2012 Oct 24;4(11):2432-47.
- 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*. 2012;88(3):246-252.
- Paiva TM, Ishida MA, Benega MA, Constantino CRA, Silva DBB, Santos KC, et al. Shift in the timing of respiratory syncytial virus circulation in a subtropical megalopolis: implications for immunoprophylaxis. *J Med Virol*. 2012 Nov;84(11):1825-30.
- Calegari T, Queiroz DA, Yokosawa J, Silveira HL, Costa LF, Oliveira TF, et al. Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005 Apr;9(2):156-6.
- Langley JM, LeBlanc JC, Wang EE, Law BJ, MacDonald NE, Mitchell I, et al. Nosocomial respiratory syncytial virus infection in Canadian pediatric hospitals: a Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada Study. *Pediatrics*. 1997 Dec;100(6):943-6.
- Thorburn K, Kerr S, Taylor N, Van saene HK. RSV outbreak in a paediatric intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2004 Jul;57(3):194-201.
- Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med*. 2001 Jun 21;344(25):1917-28.
- Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev*. 2004;5 Suppl A:S119-26.
- Hirsh S, Hindiyeh M, Kolet L, Regev L, Sherbany H, Yaary K, et al. Epidemiological changes of respiratory syncytial virus (RSV) infections in Israel. *PLoS One*. 2014 Mar 3;9(3):e90515.
- Oliveira TF, Freitas GR, Ribeiro LZ, Yokosawa J, Siqueira MM, Portes SA, et al. 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*. 2008 Aug;103(5):417-22.
- Noah JW, Severson W, Chung DH, Moore B, Jia F, Xu X, et al. A Cell Based HTS Approach for the Discovery of New Inhibitors of RSV. *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010.
- Zomer-Kooijker K, van der Ent CK, Ermers MJ, Uiterwaal CS, Rovers MM, Bont LJ; RSV Corticosteroid Study Group. Increased risk of wheeze and decreased lung function after respiratory syncytial virus infection. *PLoS One*. 2014 Jan 31;9(1):e87162.
- Costello HM, Ray WC, Chaiwatpongsakorn S, Peebles ME. Targeting RSV with vaccines and small molecule drugs. *Infect Disord Drug Targets*. 2012 Apr;12(2):110-28.
- Schepens B, Sedeyn K, Ginste LV, Baets S, Schotsaert M, Roose K, et al. Protection and mechanism of action of a novel human respiratory syncytial virus vaccine candidate based on the extracellular domain of small hydrophobic protein. *EMBO Mol Med*. 2014 Nov;6(11):1436-54.
- Alvarez AE, Marson FAL, Bertuzzo CS, Arns CW, Ribeiro JD. Epidemiological and genetic characteristics associated with the severity of acute viral bronchiolitis by respiratory syncytial virus. *J Pediatr (Rio J)*. 2013 Nov-Dec;89(6):531-43.
- Lamarao LM, Ramos FL, Mello WA, Santos MC, Barbagelata LS, Justino MC, et al. Prevalence and clinical features of respiratory syncytial virus in children hospitalized for community-acquired pneumonia in northern Brazil. *BMC Infect Dis*. 2012 May 16;12:119.
- Reis AD, Fink MCD, Machado CM, Paz JP, Oliveira RR, Tateno AF, et al; CHIADO and RDGV/FAPESP Research Groups. 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 Sao Paulo*. 2008 Jan-Feb;50(1):37-40.
- Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol*. 1998 Oct;36(10):2990-5.
- Nunes IFS. 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.
- Salomão Junior JB, Gardinassi LG, Simas PV, Bittar CO, Souza FP, Rahal P, Zanetta DM. Human respiratory syncytial virus in children hospitalized for acute lower respiratory infection. *J Pediatr (Rio J)*. 2011 May-Jun 8;87(3):219-24. [Article in English, Portuguese].
- Freitas TV, Ono G, Corrêa L, Gomes PS, Galante NZ, Tedesco-Silva H, et al. Clinical manifestations and evolution of infection by influenza A (H1N1) in kidney transplant recipients. *J Bras Nefrol*. 2011 Apr-Jun;33(2):136-41.
- Pecchini R, Berezin EN, Felício MC, Passos SD, Souza MC, Lima LR, et al. 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*. 2008 Dec;12(6):476-9;
- Donalísio MR, Francisco PMSB, Latorre MRDO. 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*. 2006;9(1):32-41.
- Connel JOE. RT-PCR Protocols. V.193. New Jersey: Humana Press Totowa, 2002.
- D'Élia C, Siqueira MM, Portes AS, Sant'anna CC. Infecções do trato respiratório inferior pelo vírus sincicial respiratório em crianças hospitalizadas menores de um ano de idade. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2005;38(1):7-10. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822005000100002&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822005000100002&lng=pt).
- Levy K, Hubbard AE, Eisenberg JN. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2009 Dec;38(6):1487-96.

Correspondência

**Fernanda Carolina Pedrosa**

R. Simeão Varela de Sá, 03 - Vila Carlí,  
85040-080 – Guarapuava, PR