Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe

Pesquisa de Vírus Respiratórios em uma População de Idosos da Cidade de Botucatu – São Paulo, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: João Manuel Grisi Candeias

Botucatu – SP
2006

Sumário

1. Introdução 2
    1.1 Revisão da literatura 5
    1.1.1 Vírus Respiratório Sincicial Humano 5
    1.1.2 Vírus Influenza 7
    1.1.3 Metapneumovírus Humano 10
2. Objetivos 16
3. Casuística e Métodos 18
    Delineamento experimental 18
    3.1 População de estudo 19
    3.2 Coleta das amostras 19
    3.3 Processamento do material clínico 19
    3.4 Manutenção da cultura de células 20
    3.5 Manutenção das cepas padrão do vírus 20
        3.5.1 Vírus Respiratório Sincicial Humano 20
        3.5.2 Vírus Influenza 21
    3.6 Shell Vial 21
        3.6.1 Vírus Respiratório Sincicial Humano 21
        3.6.2 Vírus Influenza 22
    3.7 Extração de RNA com Trizol-LS 22
    3.8 Transcrição reversa (“RT-PCR”) 23
    3.9 Controle de extração e síntese de cDNA (gene da β-actina) 23
    3.10 Amplificação do ácido nucléico (“PCR”) 24
        3.10.1 Vírus Respiratório Sincicial Humano 24
        3.10.2 Vírus Influenza 25
    3.11 Amplificação do produto de “PCR” (“nested-PCR”) 25
        3.11.1 Vírus Respiratório Sincicial Humano 25
        3.11.2 Vírus Influenza 26
    3.12 Visualização dos produtos amplificados 27
    3.13 GeneScan para Vírus Influenza, HRSV e hMPV 27
        3.13.1 Amplificação do cDNA – GeneScan (múltiplo PCR) 28
        3.13.2 Detecção dos produtos amplificados (GeneScan) 28
    3.14 Tipagem das amostras positivas por sequenciamento 29
    3.15 Análise dos fatores de risco 31
4. Resultados 33
    4.1 Shell vial para o Vírus Influenza 33
    4.2 Shell Vial para o HRSV 33
    4.3 PCR para a β-actina 34
    4.4 RT-PCR para o Vírus Influenza 34
    4.5 RT-PCR para o HRSV 35
    4.6 GeneScan RT-PCR 35
    4.7 Resultados obtidos pela GS RT-PCR 36
    4.8 Resultados obtidos pelo Sequenciamento 36
    4.9 Fatores envolvidos nas doenças 38
        4.9.1 Vacinação 38
        4.9.2 Idade 38
        4.9.3 Período de coleta 39
        4.9.4 Tabagismo 39

4.9.5 Sexo dos pacientes 40
4.9.6 Incidência de sintomas respiratórios mais comuns 40
4.9.7 Tempo de coleta após o aparecimento dos sintomas 41
5. Discussão 43
Vacinação 45
Idade 47
Período de coleta 47
Tabagismo 48
Sexo dos pacientes 49
Incidência de sintomas respiratórios mais comuns 50
Tempo de coleta após o aparecimento dos sintomas 50
6. Conclusões 53
7. Referências Bibliográficas 55
8. Anexos 61
Anexo 1 62
Anexo 2 64
Anexo 3 65
Anexo 4 66
Anexo 5 67

1. Introdução

Infecções respiratórias causadas por vírus têm sido reconhecidas como um importante fator de contribuição para a morte e a incapacitação de adultos idosos. As razões da associação destes agentes infecciosos, que habitualmente causam enfermidades auto-limitantes em adultos sadios, com o avanço de doenças conforme o aumento da idade não são completamente conhecidas. A análise desse problema é agravada pela dificuldade em separar os efeitos da idade em si das doenças crônicas que freqüentemente acompanham o envelhecimento[1].

O vírus Influenza, ou Vírus da Gripe, tem recebido grande atenção e persiste como um problema significante em populações de idosos, enquanto o Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) é apontado como uma causa potencial de doenças agudas em indivíduos idosos[1]. O Metapneumovírus Humano (hMPV) tem sido considerado um importante causador de infecções severas do trato respiratórios em crianças, idosos e adultos imunocomprometidos[45].

Os Vírus Influenza A e B são causadores comuns de doenças respiratórias agudas. Os dois tipos podem causar epidemias com alta morbidade e mortalidade. Infecções causadas pelo Influenza B são freqüentemente limitadas a aparições localizadas, no entanto o tipo A é o principal causador de grandes epidemias e pandemias mundiais. Nas regiões temperadas o Influenza ocorre principalmente no inverno e afeta de 1 a 5% da população. Nas regiões tropicais o vírus pode ser contraído ao longo do ano e sua contribuição para altas morbidade e mortalidade não está bem definida [65].

As taxas de infecção são maiores em crianças, mas a doença mais severa é comum em idosos e grupos específicos de alto risco. Em idosos acima de 65 anos as taxas de morbidade e mortalidade aumentam significativamente. Muitas condições de saúde predispõem complicações. Essas condições incluem doenças pulmonares e cardíacas crônicas, doenças metabólicas como diabetes melitus e disfunções renais, e vários tipos de imunossupressão. Estudos em gestantes sugerem um aumento da severidade após o primeiro trimestre[65].

Em muitos países desenvolvidos, o conhecimento a cerca de epidemias locais de Influenza é insuficiente ou não existe. O impacto econômico das epidemias de Influenza é considerável. Em países industrializados o custo total estimado é de 10 – 60 milhões de dólares por milhão de pessoas. Em 1997 foi relacionado um tipo de Influenza não-epidêmico com 5600 casos de pneumonia e mortes relacionadas a esse vírus, e 21.300 mortes causadas especificamente por Influenza em todo o EUA[42]. Desde 1980 é conhecido que tanto o Influenza A quanto o Influenza B estão associados a doenças respiratórias severas[43].

O Influenza A sofre freqüente mudanças nos seus antígenos de superfície. Já no tipo B essas mudanças são menos freqüentes. A imunidade após uma infecção por um subtipo pode não proteger totalmente o indivíduo contra uma nova variante antigênica. Entre os adultos saudáveis a vacina contra o Influenza tem uma taxa de proteção que varia de 50 a 80%, mas em idosos a diminuição dos riscos de complicações sérias e morte chega a 85%[65].

O HRSV é um dos mais importantes causadores de infecções do trato respiratório inferior em recém nascidos e crianças jovens, causando aproximadamente 90.000 hospitalizações e 4500 mortes anualmente nos USA. Tradicionalmente a infecção severa por HRSV tem sido considerada um problema de infância. No entanto o HRSV foi recentemente identificado como um causador comum de doenças sérias em populações de adultos, incluindo imunocomprometidos, idosos fragilizados e pessoas com doenças cardio-pulmonares crônicas. Entre os idosos o HRSV é um causador comum de morbidade e mortalidade[1].

Em um estudo de prevalência com 55 idosos em casas de repouso realizado em Rochester, Nova York, o HRSV causou 27% das 149 infecções agudas do trato respiratório detectadas durante um inverno[1]. O HRSV infecta anualmente de 3 – 7% dos idosos saudáveis ao redor do mundo[66].

Junto com dados clínicos de infecções respiratórias do trato inferior existem evidências de uma crescente contribuição do HRSV para altas taxas de morbidade entre os idosos. O impacto do HRSV em idosos é menos percebido do que em crianças, mas existe um aumento de evidências que mostram que esse vírus pode ser tão prejudicial quanto o Influenza não-epidêmico.

Estudos recentes têm mostrado que o Metapneumovírus Humano (hMPV) é um causador emergente de infecções respiratórias agudas nos primeiros anos de vida, e que esse agente possui um espectro de doença similar ao HRSV. Pesquisadores canadenses e ingleses descreveram pacientes com doença respiratória que possuíam de 2 meses a 87 anos, dos quais o hMPV foi identificado por isolamento em cultura celular ou RT-PCR, o que indica que a infecção causada por esse agente pode acometer uma grande faixa etária .

As técnicas de amplificação do ácido nucléico (Polymerase Chain Reaction – "PCR"), usadas no diagnóstico de viroses respiratórias têm se apresentado como uma tecnologia poderosa, que pode com sucesso, atender duas necessidades críticas na área de diagnóstico laboratorial: sensibilidade e especificidade. A especificidade de um teste diz respeito à capacidade desse teste de detectar verdadeiros positivos, enquanto a especificidade diz respeito à capacidade do teste de detectar verdadeiros negativos. Os três principais métodos utilizados atualmente na detecção de viroses respiratórias: isolamento em cultura de células, imunofluorescência (IF) e ensaio imunoenzimático (EIA), apresentam certas desvantagens com relação à "PCR". O isolamento em cultura de células não é suficientemente rápido para influenciar a conduta de médicos em relação aos pacientes na maioria dos casos. Para a realização da IF são necessários laboratórios com funcionários experientes e amostras com boas quantidades de vírus. Essas condições favorecem grandes centros médicos, e desfavorecem pequenos laboratórios. A EIA é de fácil realização, mas em relação aos outros métodos é mais caro e o diagnóstico detecta somente um ou dois tipos de vírus. A "PCR" é rápida, pois pode ser realizada em 1 dia, tem alta sensibilidade e se necessário, alta especificidade. Esse método é considerado uma ferramenta valiosa para laboratórios interessados na identificação de viroses respiratórias, porque pode identificar rapidamente tipos determinados de vírus e até mesmo linhagens mutantes resistentes a agentes antivirais, e permite também monitorar a transmissão de tais agentes[2].

Uma variação na análise do produto de PCR, e que foi utilizada nesse trabalho, é o ensaio de RT-PCR detectado por GeneScan (GS-RT-PCR). O GeneScan (GS) é uma técnica de análise de fragmentos de DNA baseada na detecção automática de

fluorescência durante eletroforese em capilar, bastante utilizada em procedimentos que requerem muita precisão no tamanho e quantidade de produto de DNA.

1.1 **Revisão da literatura**

1.1.1 **Vírus Respiratório Sincicial Humano**

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) foi reconhecido em 1956 por MORRIS et. al. durante uma contaminação em um laboratório americano. O vírus foi isolado de um chipanzé que apresentava um "frio severo" semelhante a um resfriado comum[3,4]. Esse novo agente foi nomeado chipanzee coriza agent (CCA). Alguns anos mais tarde dois agentes similares ao CCA foram isolados de duas crianças com problemas no trato respiratório[5,6]. Uma característica notável observada nas culturas celulares inoculadas com as amostras colhidas destas crianças, foi à produção de um efeito citopático denominado sincício[7,8,9]. Desde então o nome CCA foi substituído por Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV).

O HRSV pertence à família *Paramyxoviridae* (Figura 1), quanto ao gênero este vírus é classificado como pneumovirus. O vírus é composto de nucleocapsídeo de simetria helicoidal envelopado de morfologia esférica, com tamanho médio de 120 a 300nm de diâmetro[11,12].

O genoma viral é composto por RNA de fita simples não segmentada e de polaridade negativa (-ssRNA)[13,14].

O envelope possui de 12 a 15nm com glicoproteínas G e F (proteína de fusão da membrana viral com a membrana plasmática da célula hospedeira que facilita a entrada do vírus na célula, além de mediar a fusão de uma célula infectada com uma adjacente proporcionando a formação de sincícios), que se apresentam na superfície exterior em intervalos regulares[8,25].

A proteína F consiste em duas cadeias com ligações sulfídicas, F_1 e F_2. A fita simples de RNA de polaridade negativa, é encapsulada com uma proteína de nucleocapsídeo (N). Associados ao nucleocapsídeo estão às proteínas L e P, e esse complexo junto tem atividade de transcriptase RNA dependente. A natureza das possíveis interações entre a maquinaria citoplasmática das glicoproteínas e a matriz

protéica, e as interações entre a matriz protéica e o nucleocapsídeo não estão completamente elucidadas[8,35].

A replicação do vírus ocorre no citoplasma celular e seu envelope tem origem na membrana plasmática da célula hospedeira[15].

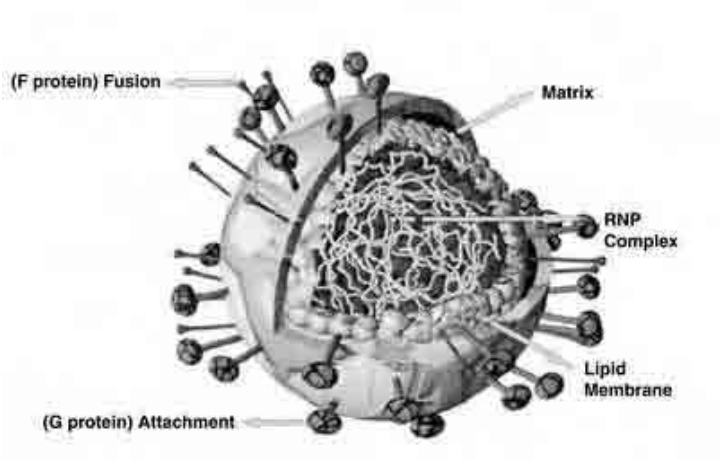


Fig. 1: Ilustração do HRSV mostrando a proteína de fusão (F) e a proteína de adsorção (G). Adaptado de Randhawa JS: A pneumovirus cartoon. Pneumovirus Laboratory Homepage. University of Warwick, Department of Biological Sciences, United Kingdom. Disponível no site: http://www.virology.net/ Big_Virology/BVRNApara.html. Accessed October 12, 2000.)

Para o HRSV, a função de antireceptor viral é exercida pelas espículas de glicoproteína G, a proteína responsável pela adsorção da partícula viral à célula hospedeira. Ainda não foi identificada qual macromolécula celular é utilizada pelo vírus como receptor para adsorção. Para os Pneumovirus suscita-se a possibilidade de que o receptor não seja uma molécula contendo ácido siálico[8]. Após a adsorção do virion à célula hospedeira, o passo seguinte é a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. Este passo é mediado por uma segunda glicoproteína de superfície, a glicoproteína F, que induz a fusão do envelope viral com a membrana celular, promovendo a liberação do nucleocapsídeo diretamente no citoplasma da célula hospedeira[24].

Todas as etapas do ciclo replicativo do HRSV ocorrem no citoplasma sem envolvimento do núcleo celular[8].

O aparecimento do HRSV numa comunidade ocorre geralmente durante o período de outono-inverno, podendo sua presença ser suspeitada pela prevalência de

casos de bronquiolite, sendo essa observação feita em diversos países. Durante os períodos inter-epidêmicos o HRSV parece desaparecer[10].

A grande diversidade genética que caracteriza o vírus, explicaria as ocorrências não epidêmicas nos indivíduos mais velhos.O HRSV é um dos principais agentes causadores de infecções do trato respiratório inferior em bebês e crianças em idade pré-escolar, tanto em países em desenvolvimento como nos desenvolvidos[10].

As manifestações clínicas do HRSV são quase sempre sintomáticas e a doença se inicia com coriza, tosse e febre, podendo se desenvolver para problemas mais sérios, como pneumonia e bronquiolite. Rinite febril e/ou faringite com envolvimento dos brônquios também podem ocorrer[10].

Os sintomas clínicos são parecidos com os causados pelo vírus da Influenza, com ou sem tosse. O Vírus Respiratório Sincicial Humano está sendo, cada vez mais, reconhecido como um importante patógeno em outros grupos que incluem pacientes imunodeprimidos e idosos[10].

1.1.2 **Vírus Influenza**

A Influenza, ou gripe, é uma doença contagiosa aguda do trato respiratório, de natureza viral e de distribuição global. Classicamente, apresenta-se com início abrupto de febre, mialgia e tosse seca e, em geral, tem evolução auto-limitada, de poucos dias. Sua importância deve-se ao caráter epidêmico, caracterizado por disseminação rápida e marcada morbidade nas populações atingidas. A gripe ocorre no mundo todo, seja de forma esporádica, como surto localizado, ou regional, em epidemias e também como devastadoras pandemias.

O potencial pandêmico do Influenza reveste-se de grande importância. Durante o século XX, foram descritas três pandemias: 1918 – Gripe Espanhola, 1957 – Gripe Asiática e 1968 – Gripe de Hong Kong, sendo a Gripe Espanhola a de efeitos mais graves, tendo causado mais de 20 milhões de mortes em todo o mundo[16]. Com os modernos meios de transporte, a propagação do vírus da Influenza tornou-se muito rápida, e hoje o mesmo vírus pode circular, ao mesmo tempo, em várias partes do mundo, causando epidemias quase simultâneas. Em anos epidêmicos, a taxa de ataque na comunidade atinge aproximadamente 15%, sendo ao redor de 2% em anos não epidêmicos. Em comunidades fechadas, este número sobre para 40 a 70%, sendo que a

taxa de ataque secundário situa-se ao redor de 30%. Tanto a morbidade quanto à mortalidade, devido ao Influenza e suas complicações, podem variar ano a ano, dependendo de fatores como as cepas circulantes, o grau de imunidade da população geral e da população mais suscetível, entre outros[17,18].

A imunidade aos vírus Influenza resulta da infecção natural, ou vacinação anterior com o vírus homólogo. Desta maneira, um hospedeiro que tenha tido uma infecção com determinada cepa do vírus Influenza, terá pouca ou nenhuma resistência a uma nova infecção, com a cepa variante do mesmo vírus[19]. Essa variação é devida à capacidade do vírus de sofrer mudanças antigênicas (“Drift antigênico”) menos acentuadas, que ocorrem, em média, a cada dois a três anos causando epidemias localizadas (Influenza A e B), ou a capacidade de rearranjar oito segmentos do RNA viral (“Shift antigênico”), que em geral ocorre com o vírus da Influenza do tipo A. Esse rearranjo acontece em média a cada dez anos, e está associado com pandemias. Estes fatores explicam, em parte, a grande capacidade deste vírus em causar freqüentes epidemias nas populações atingidas. Os vírus Influenza (Figura 2) pertencem à família *Orthomyxoviridae* e subdividem-se em 3 tipos: A, B e C, de acordo com sua diversidade antigênica. São vírus altamente transmissíveis e mutáveis. Os tipos A e B causam maior morbidade e mortalidade que o tipo C e, por isso, merecem destaque em saúde pública. Os virions são pleomórficos, freqüentemente esféricos com 80 a120nm de diâmetro. Os virions contém envelope com grandes peplômeros com cerca de 10 a 14nm de comprimento e 4 a 6nm de diâmetro (consistindo formas triméricas de hemaglutinina e tetraméricas de neuraminidase) dentro do qual encontram-se 8 (Influenza A e B) ou 7 (Influenza C) nucleocapsídeos helicoidais medindo cada um de 130 a 150nm de comprimento. O genoma consiste de 8 (influenza A e B) ou 7 (Influenza C) moléculas de RNA de fita simples linear de polaridade negativa (-ssRNA) com 10 a 13,6 kb (todos os segmentos). Os vírus normalmente tem de 7 a 9 proteínas principais e as que se apresentam em todos os gêneros são: PA, PB1 e PB2 (três enzimas com atividade de RNA polimerase RNA dependente e endonuclease); NP (principal componente do nucleocapsídeo); HA (hemaglutinina) e M1 ou M (proteína não glicosilada do envelope). Três tipos de proteína integral de membrana: hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA), e pequenas quantidades de proteína de

canal iônico M2, estão inseridas na bicamada lipídica da membrana viral. A proteína M1, da matriz do virion, se localiza abaixo da bicamada lipídica, mas também interage com as ribonucleoproteínas helicoidais (RNPs). Dentro do envelope estão oito segmentos de RNA de fita simples (variando de 2341 a 890 nucleotídeos), que estão na forma de RNP. Associados com as RNPs estão pequenas quantidades de complexo de transcriptase, consistindo das proteínas PB1, PB2 e PA. Os segmentos 7 e 8 do RNA codificam cada um mais de uma proteína (M_1 e M_2; e NS_1 e NS_2 respectivamente). NS_1 é encontrada somente em células infectadas, e não é componente estrutural do vírus, mas pequenas quantidades de NS_2 estão presentes em virions purificados[26].

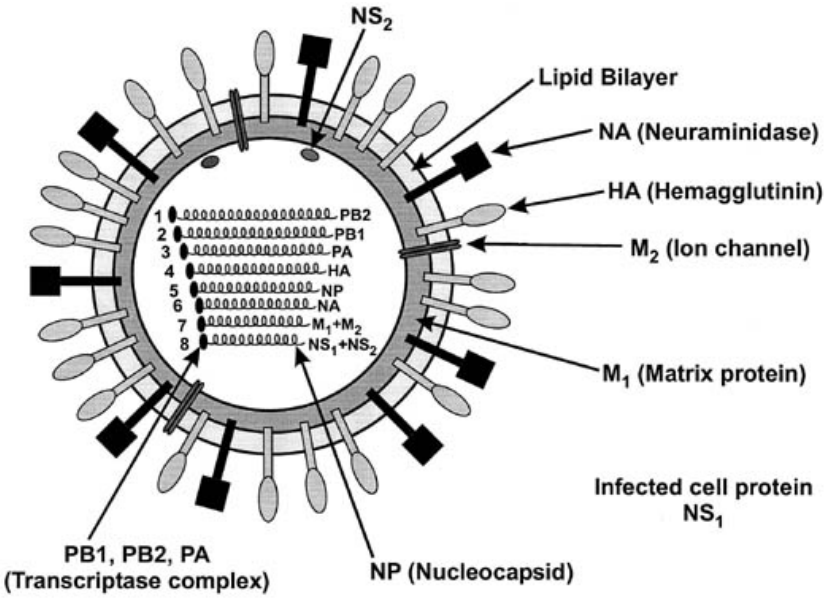


Fig. 2. Diagrama esquemático da estrutura da partícula viral de Influenza A[26].

A transcrição e a replicação do Vírus Influenza acontecem no núcleo da célula infectada, diferente da maioria dos vírus RNA de fita simples negativa[27].

Clinicamente, a doença inicia-se com a instalação abrupta de febre alta, em geral acima de 38ºC, seguida de mialgia, dor de garganta, prostração, dor de cabeça e tosse seca. A febre é, sem dúvida, o sintoma mais importante e perdura em torno de três dias. Os sintomas sistêmicos são muito intensos nos primeiros dias da doença. Com sua progressão, os sintomas respiratórios tornam-se mais evidentes e mantêm-se em

geral por 3 a 4 dias, após o aparecimento da febre. É comum a queixa de garganta seca, rouquidão, tosse seca e queimação retro-esternal ao tossir.

Os pacientes apresentam-se toxemiados ao exame clínico, com a pele quente e úmida, olhos hiperemiados e lacrimejantes. Há hiperemia das mucosas, com aumento de secreção nasal hialina. O quadro clínico em adultos sadios apresenta bastante variabilidade[20]. Nas crianças, a temperatura pode atingir níveis mais altos, sendo comum o achado de aumento dos linfonodos cervicais[21].

Quadros de crupe, bronquite e bronquiolite, além de sintomas gastrointestinais, também podem fazer parte da apresentação clínica em crianças. Os idosos quase sempre se apresentam febris, às vezes sem outros sintomas, mas em geral a temperatura não atinge níveis tão altos. As complicações são mais comuns em idosos e indivíduos debilitados. As situações sabidamente de risco, incluem doenças crônicas pulmonares (Asma e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica-DPOC), cardiopatias (Insuficiência Cardíaca Crônica), doenças metabólicas crônicas (Diabetes, por exemplo), imunodeficiência ou imunodepressão, gravidez, doenças crônicas renais e hemoglobinopatias[20].

As complicações pulmonares mais comuns são as pneumonias bacterianas secundárias, sendo mais freqüentes as provocadas pelos seguintes agentes: Streptoccocus pneumoniae, Staphylococcus e Haemophillus influenzae. Uma complicação incomum, e muito grave, é a Pneumonia Viral Primária pelo vírus da Influenza. A transmissão se dá através das vias respiratórias, quando indivíduos infectados transmitem o vírus às pessoas susceptíveis, ao falar, espirrar e tossir, através de pequenas gotículas de aerossol. Apesar da transmissão inter-humana ser a mais comum, já foi documentada a transmissão direta do vírus, a partir de aves e suínos para o homem[22].

1.1.3 **Metapneumovírus Humano**

O Metapneumovírus Humano (hMPV) foi descrito em 2001 por Van Den Hoogen e colaboradores, que relataram o isolamento de um novo membro da família Paramyxoviridae em 28 pacientes com infecção no trato respiratório inferior (ITR) na Holanda. Com base na similaridade da seqüência de seus genes com o Pneumovírus Aviário (APV), esse vírus foi classificado como um novo membro do gênero

Metapneumovírus[30]. Esse novo agente foi isolado de aspirados nasofaríngeos de crianças jovens hospitalizadas com doença no trato respiratório inferior de variados graus de severidade[30]. Apesar desse vírus haver sido isolado pela 1ª vez somente em 2001, o metapneumovírus humano (hMPV) está presente na população desde pelo menos 1950[30].

O hMPV é causa freqüente de doenças do trato respiratório em crianças e adultos ao redor do mundo[31]. Nos EUA o hMPV foi encontrado em até 20% dos pacientes com doença do trato respiratório inferior[32].

De maneira similar ao HRVS, infecções por hMPV são mais frequentes durante os meses frios em regiões temperadas do planeta[33]. Pouco se sabe ,porém, sobre a sazonalidade da infecção por hMPV em países de clima tropical.

Estudo recente com crianças e idosos hospitalizados devido a infecções respiratórias durante a estação de HRSV (principalmente inverno) em países temperados, mostrou uma associação entre hMPV e o HRSV em aproximadamente 11% das doenças[34]. Assim como o HRSV, infecções por hMPV são comuns na infância, sendo que a maioria das crianças com até 5 anos de idade têm evidência sorológica de infecção por esse vírus. A associação entre doença e a alta incidência, tornam o hMPV um agente patogênico de importância comparável ao HRSV.

O hMPV pertence à família Paramyxoviridae , subfamília Pneumovirinae, gênero Metapneumovirus. Essa famíla é composta por vírus envelopados, com genoma de RNA fita simples (ssRNA), de polaridade negativa, não segmentada e cuja replicação ocorre inteiramente no citoplasma. As partículas virais são geralmente esféricas de 150 a 300 nm de diâmetro, mas elas também podem ser pleiomórficas ou filamentosas. O envelope viral bilipídico é derivado da membrana plasmática da célula hospedeira e contém na sua superfície a proteína F, que media a fusão de envelope viral com a membrana plasmática da célula e a proteína G que está envolvida na interação vírus-célula. Dentro do envelope há um nucleocapsídeo helicoidal constituído por RNA genômico e a proteína do nucleocapsídeo (N). No interior do nucleocapsídeo estão presentes a fosfoproteína (P) e a polimerase viral (L), que é uma RNA polimerase RNA-dependente, responsável pela iniciação da replicação viral na célula infectada.

Entre o envelope e o nucleocapsídeo está a proteína viral de matriz (M), importante na arquitetura do vírion e que é liberada durante a entrada do vírus[35].

O RNA gênomico dos Paramyxovírus, assim como a maioria dos vírus de RNA fita simples negativa serve para duas funções: primeiro, ele funciona como uma cópia para síntese de mRNAs, e segundo, ele serve como cópia para a síntese da fita do antigenoma (+)[35].

A infecção por hMPV parece ter características clínicas similares às presentes na infecção por hRSV, como rinite, faringite, bronquite, bronquiolite e pneumonia[36]. A severidade da doença varia desde resfriado comum até o óbito[36]. Apesar dessa semelhança, existem relatos de uma maior freqüência de pneumonia em pacientes infectados por hRSV (5 dentre 12 crianças infectadas por hRSV contra 1 dentre 8 crianças infectadas por hMPV)[37].

A infecção por hMPV está associada à doença pulmonar exacerbada, perda de peso e desenvolvimento de uma resposta imune humoral, com a infecção podendo persistir no pulmão até 60 dias pós-infecção. Observações citológicas e histopatológicas indicam que o hMPV afeta primeiramente o epitélio das vias aéreas e promove produção de muco nessas vias, o que está de acordo com o aumento de inflamação brônquica e bronquiolar observados[38].

Estudos recentes sugerem um mecanismo patogênico que inclui infecção direta das células epiteliais das vias aéreas resultando em degeneração, necrose, resposta neutrofílica e aumento da produção de muco. A destruição do tecido é suficientemente severa para resultar em hemorragia local. Estágios tardios da doença incluem características de uma inflamação crônica e/ou cicatricial das voas aéreas com concomitante obstrução da via aérea e dano à camada mucociliar[39].

A patologia da infecção por hMPV compartilha algumas morfologias semelhantes à de infecções por outros vírus, como inclusões vermelhas citoplasmáticas dentro de células epiteliais das vias aéreas, que podem ser vistas também em infecções causadas por hRSV, Vírus Parainfluenza (PIV) e pelo Vírus da sarampo[39].

Em 2001 foi encontrado 100% de soroprevalência, com títulos neutralizantes estáveis contra o hMPV, em adultos jovens e idosos, o que indica que a re-infecção

durante a vida é comum[30]. Em 2003 foi confirmado que a infecção por hMPV ocorre tanto em crianças quanto em idosos[34].

Similar a outras viroses respiratórias, o impacto clinico do hMPV é grande em idosos fragilizados. A maior parte dos idosos saudáveis tolera bem a infecção pelo hMPV sem seqüelas sérias, no entanto aqueles com problemas cardiopulmonares freqüentemente necessitam de cuidados médicos.

A vigilância da etiologia das infecções respiratórias volta-se em especial, ao monitoramento da circulação do vírus da influenza. As ações têm sido coordenadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), contando com a participação de 110 laboratórios em 80 países. A partir de 1995 constituiu-se o Grupo Regional de Observação da Gripe (GROG). No Brasil, o Instituto Adolfo Lutz atua em parceria com o Centro de Estudos do Envelhecimento da Universidade Federal de São Paulo na condução do Projeto de Vigilância Epidemiológica da Gripe (Vigivigripe)[64] para o monitoramento das infecções respiratórias virais, além da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Rio de Janeiro e o Instituto Evandro Chagas, em Belém.

O Sistema de Vigilância Epidemiológica no país tem incorporado a vigilância em sítios sentinela, no sentido de racionalizar a investigação epidemiológica, reduzir custos e viabilizar diagnósticos de doenças de difícil acompanhamento universal. Estas estratégias têm sido valiosas por serem indicativas de risco de doenças na comunidade[64].

As vacinas desenvolvidas contra a gripe necessitam de um constante monitoramento da prevalência dos tipos de vírus da Influenza, pois as taxas de mutação de tal microorganismo são muito altas, o que faz com que estas vacinas não sejam ativas por muito tempo. O HRSV e o hMPV têm sido reconhecidos como importantes agentes causadores de problemas respiratórios em idosos.

Trabalhos com objetivo de estudar a ocorrência e os fatores envolvidos no desenvolvimento das doenças causadas por esses importantes vírus em populações de idosos são escassos, principalmente no Brasil, o que nos levou a realizar tal estudo.

Para detectar tais vírus foram utilizadas técnicas de biologia molecular (RT-PCR, GeneScan e sequenciamento) e também o isolamento em cultura de células, de amostras de idosos da cidade de Botucatu. Quanto aos fatores que envolvem as

doenças causadas por estes vírus foram analisados os prontuários disponíveis dos pacientes, dados conseguidos pela equipe médica responsável pela coleta das amostras e também foi realizada uma pesquisa na literatura relativa a esse assunto.

2. Objetivos

Objetivo geral

- Pesquisar os Vírus Influenza, HRSV e hMPV em uma população de idosos na cidade de Botucatu.

1 Objetivos Específicos

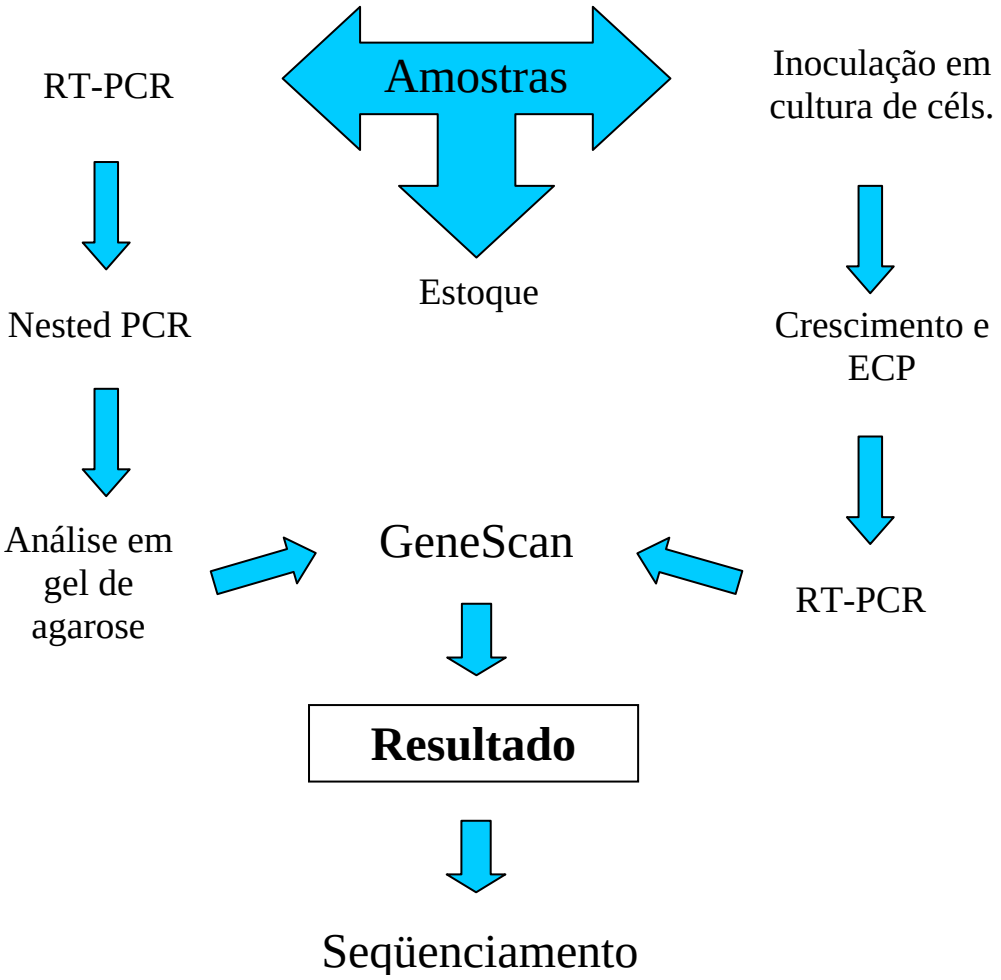
- Analisar a ocorrência do Vírus Influenza, do HRSV e do hMPV.

- Realizar o sequenciamento das amostras positivas.

- Discutir os principais fatores envolvidos no desenvolvimento das doenças causadas por estes vírus em idosos.

3. Casuística e métodos

Delineamento experimental



3.1 ***População de estudo***

Para o presente estudo foram utilizadas amostras de 47 idosos com mais de 60 anos de idade, e que fazem parte de um estudo de infecções respiratórias virais em coorte de idosos residentes na zona urbana de Botucatu – SP, realizado por docentes da Faculdade de Medicina da UNESP - Campus de Botucatu, que investigou um total de 365 idosos (anexo 1). As coletas foram realizadas durante o período de 1º de abril de 2003 a 19 de maio de 2004 em idosos que referiam sintomas respiratórios.

Todas as amostras foram colhidas conforme normas estabelecidas (anexo 1) no projeto: "Infecções respiratórias virais em coorte de idosos. Incidência etiologia e gravidade" (517/2003 - CEP), ao qual este estudo está vinculado. Todas os pacientes incluídos no estudo foram previamente informados quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 4) tendo sido o projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, tendo o número de protocolo 42/2006 – CEP, de acordo com a portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (anexo 5).

3.2 ***Coleta das amostras***

Foram colhidas amostras de swab de nasofaringe de idosos que referiam queixa de sintomas respiratórios (febre, tosse e cefaléia ou mialgia), em até 36 horas antes da coleta. Estes pacientes foram atendidos em domicílio por uma equipe (anexo 1) da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu. Para a coleta das amostras foi utilizada solução salina tamponada fosfatada (PBS) 0,01M pH 7,2 estéril. Após as narinas dos idosos terem sido limpas, o material clínico foi armazenado em tubo do tipo Falcon contendo 2mL de PBS e mantido sob refrigeração (4ºC) até o seu posterior processamento (± 1 dia).

3.3 ***Processamento do material clínico***

O material colhido foi transportado até o laboratório sob refrigeração (4ºC), sendo processado no mesmo dia em cabine de segurança, e mantido sempre em gelo. O tubo Falcon foi agitado em vórtex, e o swab foi retirado. O material clínico foi tratado com adição de 20µl de penicilina 1000 U/mL + 20µL de fungizona (200µg/mL) para um volume final de 2mL.

A seguir, a amostra foi separada nas seguintes alíquotas: 1) uma, em duplicata, para ser analisada por "RT-PCR", onde 250µL de amostra foram adicionados a 750µL de Trizol LS (GIBCO BRL) e acondicionadas em freezer –70ºC; 2) 500µL foram adicionados em igual volume de meio de congelamento (Meio Mínimo Essencial de Eagle-MEM-Sigma com 20% de Soro Fetal Bovino-Cultilab e 15% de glicerol esterelizado-Sigma), e estocados em freezer –70ºC para posterior utilização; 3) uma alíquota de 200µL que foi inoculada em cultura de células utilizando o processo de "Shell Vial".

3.4 ***Manutenção da cultura de células***

Para o isolamento de HRSV foi utilizada uma linhagem de células Hep-2 (de carcinoma de laringe humano). Estas células foram cultivadas em garrafas de 25cm^2, em MEM sem adição de antibióticos, e com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Após o crescimento que, acontece normalmente em dois dias, as células foram repicadas com auxílio de solução de ATV (0,2% de tripsina e 5% de EDTA).

Para o isolamento do vírus da Influenza foi utilizada uma linhagem de células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). Estas células foram cultivadas em garrafas de 25cm^2, em Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM) sem adição de antibióticos, e com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB).

Após o crescimento que, acontece normalmente em dois dias, as células foram repicadas com auxílio de solução de ATV (0,2% de tripsina e 5% de EDTA).

3.5 ***Manutenção das cepas padrão do vírus***

3.5.1 *HRSV*

Foram utilizadas como amostras padrão para controle positivo na "RT-PCR" o ácido nucléico (RNA) extraído de cepas de HRSV A2T3 e B18537 gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Edson Luis Durigon do ICB-USP. Para o cultivo das cepas, foram utilizadas células Hep-2 crescidas em garrafas até 80% de confluência.

A seguir, o meio de crescimento (MEM + 10% SFB) foi retirado e foram inoculadas 1mL dos padrões HRSV A2T3 e B18537. Após incubação em estufa a 37ºC por 1 hora, com agitação, foram adicionados 5mL de meio de cultura MEM acrescidos com 2% de SFB. Para o controle negativo foram inoculados 1mL de MEM em outra cultura de Hep-2..

As células inoculadas foram observadas diariamente por um período de 7 a 14 dias até o aparecimento de Efeito Citopático (ECP).

3.5.2 *Vírus Influenza*

Foram utilizadas como amostras padrão para controle positivo na "RT-PCR" o ácido nucléico (RNA) extraído dos tipos de Influenza A/Belém/124/01 e B/Ceará/276/01 gentilmente cedidas pelo Dr. Willer Alencar de Melo, do Instituto Evandro Chagas do Pará. Para o cultivo dos tipos, utilizamos as células MDCK cultivadas em garrafas até 80% de confluência. A seguir, o meio de crescimento foi retirado e foram inoculadas 1mL das amostras FLU A e FLU B.

Após incubação em estufa a 37ºC por 1 hora, com agitação, foram adicionados 5mL de meio de cultura MEM acrescidos com 10% de tripsina 0,25%.As células inoculadas foram observadas diariamente por um período de 5 a 7 dias até o aparecimento de Efeito Citopático (ECP).

Em seguida, as culturas de células inoculadas com os vírus padrão foram coletadas, e ressuspendidas em 3mL de meio de cultura MEM com 15% de glicerol estéril, e armazenadas em freezer –70ºC. Para o HRSV foi acrescido 20% de SFB ao meio de congelamento.

3.6 **Isolamento em cultura de células através do método "Shell Vial"** [28]

3.6.1 *HRSV*

Após o crescimento nas garrafas de cultura, as células foram cultivadas em placas de 24 orifícios (NUNCLON™-Denamark) até 70-80% de confluência. O meio de crescimento foi retirado e então foram inoculados 300μL de todas as 50 amostras, em dois orifícios, fazendo sempre o controle de células (cc) no terceiro orifício. A placa então foi centrifugada a 700xg por 45 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação foram adicionados 700μL de MEM com 2% de SFB. A incubação das células foi realizada nas condições descritas no item anterior, além da atmosfera de 5% de CO_2 durante todo o crescimento.

3.6.2 *Vírus Influenza*

O método "Shell Vial" foi idêntico ao utilizado para o HRSV, com a diferença de que foi acrescido 10% de tripsina 0,25% ao MEM após a centrifugação, e não foi adicionado SFB.

Depois de três dias, observando o aparecimento de ECP ou não, o material para análise de ambos os vírus foi colhido e inoculado novamente em uma nova cultura. Esse processo foi realizado três vezes (3ªpasssagem). Após a coleta do material foi realizada a extração de RNA com Trizol-LS (Invitrogen ®).

3.7 ***Extração de RNA com Trizol-LS*** (Invitrogen ®)

O método de extração do RNA total das amostras foi idêntico tanto para o HRSV como para o Vírus Influenza.

O método utilizado para extração de RNA foi o mesmo tanto para a alíquota que foi adicionada ao Trizol-LS, quanto para o material obtido através do "Shell Vial". No caso do Shell Vial, 250μL do material obtido foram adicionados a 750μL de Trizol-LS.

Estas amostras foram agitadas em vórtex e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, após a incubação foi adicionado 200μL de clorofórmio

(99,9% Merck) ao material, que foi agitado em vórtex por 15 segundos, e deixado à temperatura ambiente por 10 minutos.

Após os 10 minutos de incubação foi realizada uma centrifugação a 12000xg durante 15 minutos a temperatura de 4ºC. Depois de Centrifugado o material apresentou três fases: fase aquosa (que contém o RNA); fase intermediária e fase vermelha (que contém o DNA).

O restante da técnica foi realizado conforme recomendação do fabricante (Invitrogen ®)

Ao final o sedimento de cada RNA extraído foi ressuspendido em 100μL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC-Sigma) com 10% de inibidor de Rnase RNAguard 1 U/mL (Pharmacia-Biotech).

Após a suspensão o material resultante foi incubado a 56ºC por 10 minutos em banho-maria, e posteriormente estocado em freezer –70ºC.

3.8 ***Transcrição reversa ("RT-PCR")***

A transcrição reversa foi idêntica tanto para o HRSV quanto para o Vírus Influenza e foi realizada em duas fases. Na fase de pré-transcrição, foi utilizado um master mix com volume total de 12μL. Esse master mix é composto de: 1μL de *random primer* 75ng (3μg/μL - Invitrogen®), 11μL da amostra de RNA e 12μL q.s.p. de água Milli-Q tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC).

Foi realizada uma incubação a 70ºC durante 10 minutos e um resfriamento até 4ºC. Na fase de transcrição, foi utilizado um master mix com volume total de 7μL. Esse segundo master mix é composto de: 4μL de First Strand Buffer 5x (Invitrogen®), 2μM de ditiotreitol (DTT) 0,1M e 1mM de deoxinucleotídeos (dNTP mix). Uma segunda incubação foi realizada a 25ºC durante 2 minutos.

Logo após essa incubação 1μL da enzima transcriptase reversa SuperScript II 20U/μL (Invitrogen) foi adicionada ao master mix. A incubação final foi realizada em termociclador MasterCycler Gradient (Invitrogen®) empregando-se os parâmetros de 25ºC durante 5 minutos, 42ºC durante 50 minutos, 70°C durante 15 minutos e resfriamento a 4ºC.

3.9 ***Controle de extração e síntese de cDNA através da amplificação do gene da β-actina***

Para monitorar a extração e a síntese de cDNA das amostras foi realizada após cada etapa de extração e síntese de cDNA, uma PCR de um gene constitutivo, a β-actina, segundo os parâmetros a seguir:

Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrifuga de 0,5mL (Axygen) em um volume total de 25μL de master mix. Esse master mix foi composto de 1X de PCR Buffer 10X (Invitrogen®); 2,0 mM de $MgCl_2$; 0,4 mM de dNTP mix; 1U de Tth DNA Polimerase e 0,4 μM de cada *primer* β-actina (+) (CGGGAAATCGTGCGTGACAT)[59] e β-actina (-) (GAACTTTGGGGGATGCTCGC)[59]; 14μL de água Milli-Q autoclavada (Milli-Q Plus, Milipore) e 2μL da amostra de cDNA. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) empregando-se os parâmetros de 94°C durante 5 minutos e 94°C durante 1 minuto para desnaturação, 60 °C durante 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C durante 1 minuto e meio para extensão, seguido de mais 34 ciclos idênticos ao descrito. Por último, a temperatura de extensão final foi de 72°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C[59]. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água Milli-Q autoclavada .

3.10 ***Amplificação do ácido nucléico ("PCR")***

3.10.1 *HRSV*

A realização dos testes de amplificação para o HRSV nas amostras clínicas seguiu o protocolo que está sendo utilizado atualmente no projeto FAPESP – Rede de Diversidade Genética de Vírus. Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,5mL (Axygen) em volume total de 25μL de master mix. Esse master mix foi composto de: tampão 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4) / 50

mM de KCl / 1,5 mM de $MgCl_2$ (Biotools); 0,25mM de dNTP mix (Amersham); 1U de Tth DNA polimerase (1000U/mL, Biotools); 0,5μM de cada *primer* FV e GAB (Tab. 1), capazes de amplificar fragmentos de 653 pares de bases (hRSV A) e 656 pares de bases (HRSV B); 13,75μL de água Milli-Q autoclavada (Milli-Q Plus, Millipore) e 5μL da amostra de cDNA.

A incubação foi realizada em termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf) empregando-se os parâmetros de 94ºC durante 5 minutos para desnaturação inicial; 94ºC durante 1 minuto para desnaturação, 55ºC durante 1 minuto para anelamento dos primers e 72ºC durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 34 ciclos idênticos ao descrito.

Finalizando, a temperatura de extensão final foi de 72ºC por 7 minutos e resfriamento a 4ºC.

3.10.2 *Vírus Influenza*

A técnica de "RT-PCR" para a pesquisa do vírus Influenza nas amostras colhidas foi obtida de protocolos utilizados com sucesso no Laboratório de Virologia, chefiado pelo Prof. Dr. Eurico Arruda Neto, da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto e até mesmo comprovado por pesquisas descritas na literatura[29].

Para as reações de "PCR" foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,5mL (Axigen) em volume total de 25μL de master mix. Esse master mix foi composto de: tampão 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4) / 50 mM de KCl (Biotools); 4,5mM de $MgCl_2$; 0,6mM de dNTP mix (Amersham); 1U de Tth DNA polimerase (1000U/mL, Biotools); 0,4μM de cada *primer* AMPA, AMPDII, BMPA e BMDII (Tab. 1), capazes de amplificar fragmentos de 640 (Influenza A) e 430 (Influenza B) pares de bases respectivamente; 9,5μL de água Milli-Q autoclavada (Milli-Q Plus, Millipore) e 5μL da amostra de cDNA.

A incubação foi realizada em termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf) empregando-se os parâmetros de 94ºC durante 3 minutos para desnaturação inicial; 94ºC durante 45 segundos para desnaturação, 45ºC durante 2 minutos para anelamento dos primers e 72ºC durante 3 minutos para

polimerização, seguido de mais 44 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final foi de 72ºC por 10 minutos e resfriamento a 4ºC. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição de ácido nucléico por água Milli-Q autoclavada.

Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição de ácido nucléico por água Milli-Q autoclavada.

3.11 ***Amplificação do produto de "PCR" ("nested-PCR")***

3.11.1 *HRSV*

Para O HRSV foi realizada uma reação de "semi-nested-PCR" onde foram utilizados os mesmos tipos de tubos de microcentrífuga e o mesmo volume final de master mix da reação de PCR. O master mix foi composto de: tampão 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4) / 50 mM de KCl / 1,5 mM de $MgCl_2$ (Biotools); 0,25mM de dNTP mix (Amersham); 1U de Tth DNA polimerase (1000U/mL, Biotools); 0,5μM de cada *primer* F1AB e GAB (Tab. 1), capazes de amplificar fragmentos de 489 pares de bases (HRSV A) e 492 pares de bases (HRSV B); 15,75μL de água Milli-Q autoclavada (Milli-Q Plus, Millipore) e 3μL da amostra de DNA.

A incubação foi realizada em termociclador de mesmo tipo do utilizado na reação de PCR, empregando-se os parâmetros de 94ºC durante 5 minutos para desnaturação inicial; 94ºC durante 1 minuto para desnaturação, 51ºC durante 1 minuto para anelamento dos primers, 72ºC durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 34 ciclos idênticos ao descrito.

Finalizando, a temperatura de extensão final foi de 72ºC por 7 minutos e resfriamento a 4ºC.

3.11.2 *Vírus Influenza*

Para a reação de "nested-PCR" foram utilizados os mesmos tipos de tubos de microcentrífuga e o volume final de master mix da reação de PCR é de 25μL. O master mix foi composto de: tampão 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4) / 50 mM de

KCl (Biotools); 4,5mM de $MgCl_2$; 0,6mM de dNTP mix 20mM (Amersham); 1U de Tth DNA polimerase (1000U/mL, Biotools); 0,4μM de cada *primer* AMPB, AMPCII, BMPBe BMPCII (Tab. 1), capazes de amplificar fragmentos de 401 (Influenza A) e 302 pares de bases (Influenza B) respectivamente, 12,5μL de água Milli-Q autoclavada (Milli-Q Plus, Millipore) e 2μL do produto de PCR.

A incubação foi realizada em termociclador de mesmo tipo do utilizado na reação de PCR, empregando-se os parâmetros de 94ºC durante 45 segundos para desnaturação, 45ºC durante 2 minutos para anelamento dos primers, 72ºC durante 3 minutos para polimerização, seguido de mais 44 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final foi de 72ºC por 10 minutos e resfriamento a 4ºC.

Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água Milli-Q autoclavada.

Virus	2 Primer	Gene	Sequência (5´>3´)	Tamanho do fragmento (pb)
HRSV (PCR)	FV (-)[a]	F	GTTATGACACTGGTATACCAACC	653 (HRSV A) e 656 (HRSV B)
	GAB (+)[b]	G	YCAYTTTGAAGTGTTCAACTT	
HRSV (Semi-nested)	F1AB (-)[c]	F	CAACTCCATTGTTATTTGCC	489 (HRSV A) e 492 (HRSV B)
	GAB (+)[b]	G	YCAYTTTGAAGTGTTCAACTT	
Influenza A (PCR)	AMPA[d]	MP	CCGTCAGGCCCCCTCAAAGC	640
	AMPDII[d]	MP	GACCAGCACTGGAGCTAGGA	
Influenza B (PCR)	BMPA[d]	MP	TGTCGCTGTTTGGAGACACA	430
	BMDII[d]	MP	AGTTTTACTTGCATTGAATA	
Influenza A (Nested-PCR)	AMPB[d]	MP	CAGAGACTTGAAGATGTCTT	401
	AMPCII[d]	MP	TGCTGGGAGTCAGCAATCTG	
Influenza B (Nested-PCR)	BMPB[d]	MP	GAAGGCAAAGCAGAACTAGC	301
	BMPCII[d]	MP	TGGCCTTCTGCTATTTCAAA	

Tab. 1: Seqüência dos p*rimers* utilizados na PCR e no Nested-PCR do Vírus Influenza e do HRSV ([a]Zheng et al., 1996; [b]Peret et al., 2000; [c]Peret et al., 1998; [d]Zhang, W., et al., 1991)[60,61,62,29].

3.12 ***Visualização dos produtos amplificados***

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese de reação em gel de agarose 1,5% (Invitrogen®) preparada em tampão 1x TBE (Tampão Borato/EDTA) e corado com Brometo de Etídio (Invitrogen®). O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com padrão de 50 pares de bases (Invitrogen®) e posteriormente fotografados sob transiluminação ultra – violeta (UV).

3.13 ***GeneScan para Vírus Influenza, HRSV e hMPV***

A técnica de genescan baseia-se na utilização de primers *específicos marcados com fluorescência FAM e diferenciados por tamanho do fragmento de DNA gerado. Utiliza-se também de um padrão de peso molecular (genescan 500 TM ROX) em cada amostra. A leitura dessa fluorescência é feita em seqüenciador utilizando o programa Genescan para quantificação e análise de fragmentos de DNA. Antes da leitura é necessária a realização de uma PCR com os primers marcados.*

Para o caso desse projeto foi realizado uma síntese de cDNA com primers *randômicos. Após essa síntese foi realizada uma PCR com primers marcados específicos para Influenza, HRSV e hMPV, e depois realizado o Genescan.*

3.13.1 *Amplificação do cDNA para a detecção pelo GeneScan (múltiplo PCR)*

A amplificação foi efetuada em placas 96 orifícios, na qual 3μL de cDNA foi diluído em tampão 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4) / 50 mM de KCl / 1,5 mM de $MgCl_2$ (Biotools), 25 pMoles de cada *primer* (Tab. 5), 1 U de Tth DNA Polimerase (biotools), 0,2 mM de cada dNTP e água UltraPure q.s.p. 25μL. As amostras foram amplificadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A amplificação foi efetuada a partir de uma etapa a 94°C por 2´, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45´´ / 54°C por 45´´ / 72°C por 45´´ e uma etapa final de 72°C por 5´. Os produtos amplificados foram estocados a 4°C.

Vírus	3 **Primer**	Gene	Sequência (5´>3´)	Tamanho do fragmento (pb)
HRSV[a]	RSVAB –F1-FAM	F	AACAGTTTAACATTACCAAGTGA	380
	RSVAB –R1		TCATTGACTTGAGATATTGATGC	
Influenza A[b]	FLUA-F1-FAM	NS1	CTAAGGGCTTTCACCGAAGA	192
	FLUA-R1		CCCATTCTCATTACTGCTTC	
Influenza B[b]	FLUB-F1-FAM	NS1	ATGGCCATCGGATCCTCAAC	241
	FLUB-R1		TGTCAGCTATTATGGAGCTG	
hMPV[c]	MPVF-F1-FAM	F	GAGCAAATTGAAAATCCCAGACA	347
	MPVF-R1		GAAAACTGCCGCACAACATTTAG	

Tab. 2: Lista dos *primers* usados nas reações de GS RT-PCR ([a]Mazzulli, T., et al., 1999; [b]Claas, E.C.J., et al., 1992; [c]Falsey, A.R., et al., 2003)[63,23,34].

3.13.2 *Detecção dos produtos amplificados (GeneScan)*

Os produtos amplificados foram analisados e quantificados utilizando o Analisador Automático de DNA ABI Prism modelo 310, com detecção para marcadores fluorescentes, utilizando o programa GeneScan para quantificação e análise de fragmentos de DNA. A genotipagem foi possível devido os primers específicos para cada agente etiológico serem marcados com fluorescência (FAM) e diferenciados por tamanho do fragmento de DNA gerado. 1μL do produto de PCR foi misturado com 12μL de formamida deionizada e 0,5μL de Sizestandard (GeneScan 500 TM Rox). A inclusão do padrão de peso molecular em cada amostra permite a compensação de eventuais variações que possam ocorrer entre as coridas eletroforéticas. Essa mistura foi colocada no Termociclador para denaturação: 95°C por 3 minutos e imediatamente colocada em gelo até a análise no aparelho.

Os produtos foram submetidos à corrida eletroforética de DNA em sequenciador ABI MODELO 310 (Applied Biosystems), os tubos foram dispostos em uma bandeja, devidamente identificados e em seguida foi dado início a eletroforese, comandados por uma computador acoplado ao equipamento. A partir desse momento iniciou-se a injeção da primeira amostra ao

interior de um capilar medindo 47 cm de comprimento, preenchido por um polímero POP- 4 (Applied Biosystems). A injeção da amostra no capilar durou 5 segundos sob uma corrente elétrica de 15.000 Volts. Após a injeção, iniciou-se a corrida eletroforética que durou cerca de 30 minutos à temperatura de 60°C.

Os fragmentos marcados foram detectados por um feixe de laser e por uma câmera CCD utilizando-se um filtro virtual "A", e em seguida foram analisados pelo programa ABI 310 GeneScan (Applied Biosystems), produzindo eletroferogramas com dados quanto ao tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) e quanto à intensidade de fluorescência em Unidades relativas de Fluorescência (URF).

3.14 ***Tipagem das amostras positivas por sequenciamento***

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o sequenciador automático ABI Prism 377 (Amersham). A amostra positiva para o DNA do hMPV foi armazenada em freezer –20°C e posteriormente, em cabine de segurança previamente esterilizada por luz ultra-violeta, foi realizada uma PCR com os *primers* hMPV (*sense*) (GAGCAAATTGAAAATCCCAGACA)[34] e hMPV (*antissense*) (GAAAACTGCCGCACAACATTTAG)[34]. Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrifuga de 0,5mL (Axigen) em um volume total de 25μL de master mix. Esse master mix foi composto de 1X de PCR Buffer 10X (Invitrogen); 2,0 mM de $MgCl_2$; 0,4 mM de dNTP mix; 1U de Tth DNA Polimerase e 0,4 μM de cada *primer*; 11μL de água Milli-Q autoclavada (Milli-Q Plus, Milipore) e 5μL da amostra de cDNA. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) empregando-se os parâmetros de 95°C durante 3 minutos e 94°C durante 45 segundos para desnaturação, 54 °C durante 45 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C durante 45 segundos para extensão, seguido de mais 34 ciclos idênticos ao descrito. Por último, a temperatura de extensão final foi de 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água Milli-Q autoclavada .

Após essa etapa, realizou-se a purificação do DNA das amostras utilizadas com o GFX™Genomic Blood DNA Purification Kit® (Amersham), conforme protocolo fornecido pelo fabricante. A seguir o DNA purificado foi quantificado em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídio, utilizando-se como referência o marcador Low Mass Ladder (Amersham). As concentrações de DNA utilizadas seguiram recomendações do fabricante do Kit Dyenamic ET Terminators de sequenciamento (Amersham).

Após a purificação e posterior quantificação, a reação de sequenciamento foi realizada utilizando o Kit Dyenamic ET Terminators de sequenciamento (Amersham) conforme o protocolo: 20µL do mix Dyenamic, 1,0µL de cada *primer*, na concentração de 2,5µMol/L e água Milli-Q autoclavada q.s.p. para 10µL. A concentração de DNA na reação variou conforme sua concentração na quantificação em gel de agarose, no intervalo de 1 a 7µL.

Os parâmetros de ciclagem utilizados foram os recomendados pelo fabricante do Kit, sendo 25 ciclos compostos por 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Após o término da reação, o DNA foi precipitado e posteriormente ressuspendido seguindo protocolo do fabricante.

O resultado foi comparado com seqüências existentes na Home Page do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Realizou-se um *Blast* para essa amostra e adotou-se identidade mínima de 95% entre a seqüência estudada e as existentes em tal site. Se a amostra apresentasse identidade abaixo da estipulada seria desconsiderada. Posteriormente as fitas sense e anti-sense foram alinhadas utilizando-se o software Mega 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), avaliando a complementaridade entre ambas, e realizando também a comparação com outras seqüências obtidas no GeneBank.

3.15 ***Análise dos fatores de risco***

Os fatores envolvidos no desenvolvimento das doenças causadas pelos vírus e que foram analisados nesse estudo foram: 1) vacinação; 2) idade; 3) período de

coleta; 4) tabagismo; 5) sexo dos pacientes; 6) sintomas respiratórios e 7) tempo de coleta após o aparecimento dos sintomas.

A análise foi feita através da leitura de prontuários e de dados conseguidos através da equipe responsável pela coleta.

4. Resultados

Das 50 amostras colhidas, 3 foram de indivíduos repetidos, mas que foram coletadas em datas diferentes da primeira coleta. Estas amostras (50) foram consideradas nas análises realizadas através de biologia molecular e cultura celular, mas as 3 repetidas foram desconsideradas no caso das análises dos fatores que influenciam as doenças.

4.1 *Shell vial para o Vírus Influenza*

Após as 3 passagens em cultura celular não foi observado efeito citopático. Mesmo sem a observação desse efeito foram realizadas as análises posteriores para todas as amostras, e para todas as passagens em cultura celular.

4.2 *Shell Vial para o HRSV*

Como no caso anterior em nenhuma das passagens foi observado efeito citopático (Fig. 3) para qualquer uma das amostras. Mesmo sem a observação desse efeito foram realizadas as análises posteriores para todas as amostras, e para todas as passagens em cultura celular.

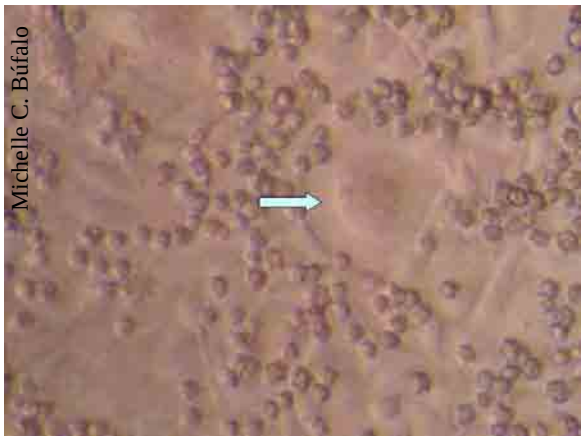


Fig. 3: Foto de cultura celular infectada com o HRSV (a seta indica um sincício).

4.3 *PCR para a β-actina*

Na figura 4 podemos observar exemplos de amplificação do gene da β-actina para 17 amostras e 1 controle positivo. Ao final do processamento, todas as amostras foram positivas para esse gene.

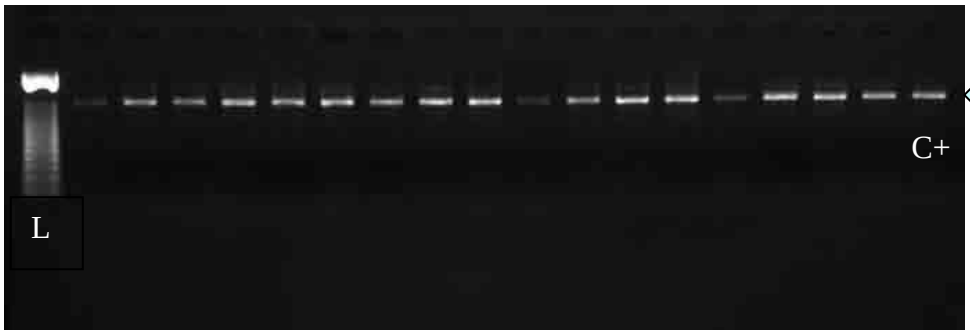


Fig. 4: Foto de gel de agarose de parte das amostras para o gene da β-actina. L indica o ladder de 50 pb. C+ indica o controle positivo. A seta mostra a altura das bandas positivas de 712 pb.

4.4 *RT-PCR para o Vírus Influenza*

Conforme pode ser observado na figura 5, nenhuma amostra foi positiva para o vírus da influenza.

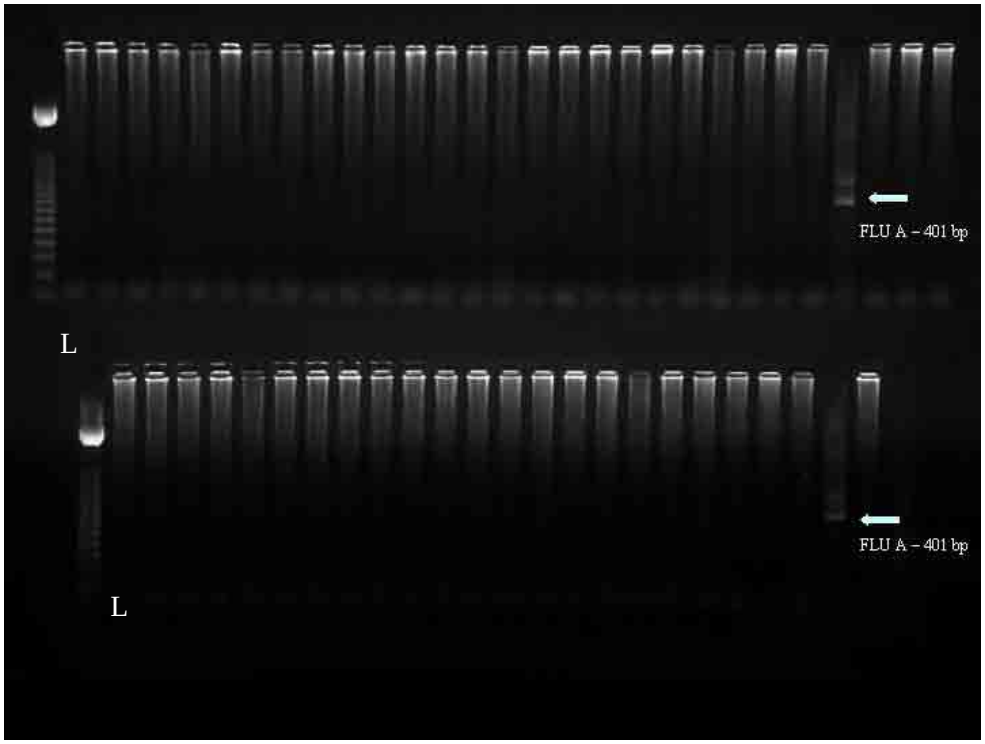


Fig. 5: Foto de gel de agarose das amostras para Influenza. L indica o ladder de 50 pb. A seta mostra a altura do controle positivo (401 pb).

4.5 *RT-PCR para o HRSV*

Nenhuma amostra analisada foi positiva para o HRSV.

4.6 *GeneScan RT-PCR*

Nas figuras 6 e 7 observa-se o resultado típico gerado pelo GS. Em azul, os picos correspondentes aos produtos esperados para cada vírus estudado pela RT-PCR, cujos tamanhos foram descritos na tabela 2; e em vermelho os picos do padrão de peso molecular (*Sizestandard).*

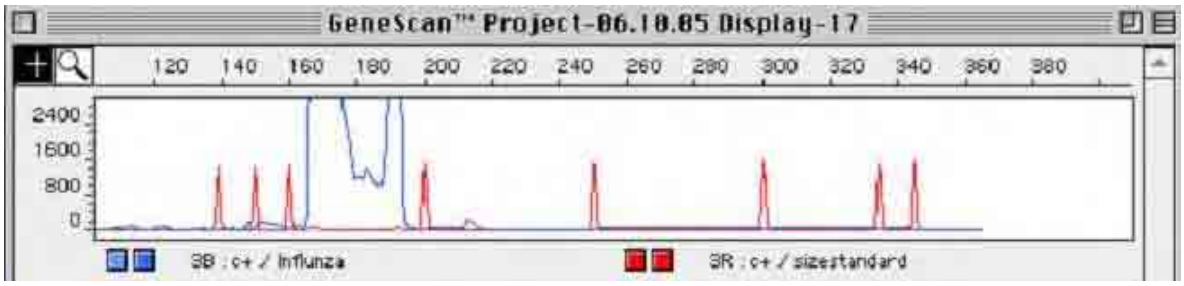


Fig. 6: Eletroferograma obtido por GeneScan mostrando o produto amplificado da RT-PCR do controle positivo para os Vírus Influenza em azul e o peso molecular (*Sizestandard*) em vermelho. No eixo X a escala está em pares de bases e no eixo Y em URF (unidades relativas de fluorescência). Tamanho do fragmento (em pb): Influenza A = segundo pico (192 pb).

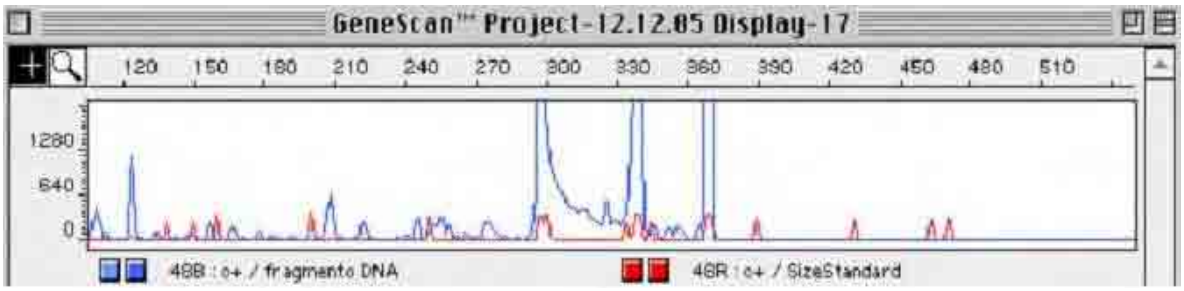


Fig. 7: Eletroferograma obtido por GeneScan mostrando os produtos amplificados da RT-PCR de controles positivos para os HRSV e hMPV em azul e o peso molecular (*Sizestandard*) em vermelho. No eixo X a escala está em pares de bases e no eixo Y em URF (unidades relativas de fluorescência). Tamanho dos fragmentos (em pb): HRSV = terceiro pico (380 pb) e hMPV = segundo pico (347 pb).

4.7 *Resultados obtidos pelo GeneScan*

Das 50 amostras diagnosticadas pelo GeneScan todas foram negativas para os Vírus Influenza e HRSV, e 1 foi positiva para hMPV (Fig. 8).

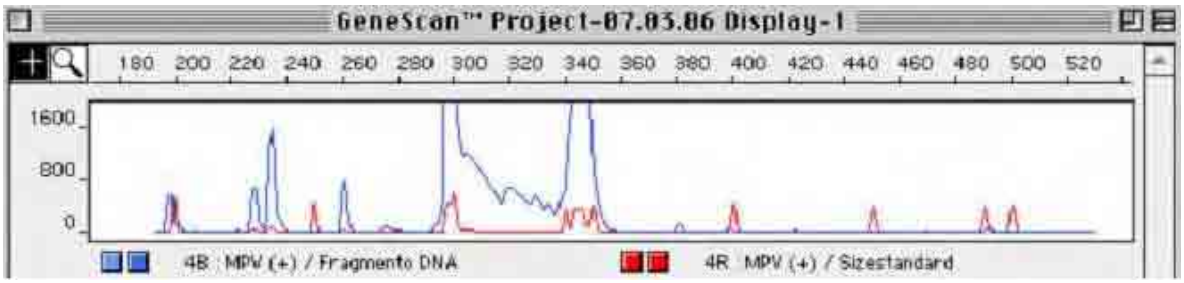


Fig. 8: Eletroferograma mostrando a amostra positiva para o hMPV em azul, segundo pico maior (347 pb).

4.8 *Resultados obtidos pelo Sequenciamento*

O resultado do Sequenciamento após análise no programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega 3.1) é apresentado na Fig. 9. A título de comparação, os 298 nucleotídeos seqüenciados do gene dessa amostra foram alinhados com as seqüências AY530089 oriunda do Japão, AY69478 oriunda da África do Sul e DQ362947 oriunda da Argentina.

```
Botucatu               ATA GCT CTC GGA GTT GCT ACA GCA GCA GCA  [30]
Japan (AY530089)       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [30]
South_Africa (AY69478) ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [30]
Argentina (DQ362947)   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [30]

Botucatu               GTC ACA GCA GGC ATT GCA ATA GCC AAA ACC  [60]
Japan (AY530089)       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [60]
South_Africa (AY69478) ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [60]
Argentina (DQ362947)   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [60]

Botucatu               ATA AGG CTT GAG AGT GAG GTG AAT GCA ATT  [90]
Japan (AY530089)       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [90]
South_Africa (AY69478) ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [90]
Argentina (DQ362947)   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [90]

Botucatu               AAA GGT GCT CTC AAA CAA ACT AAT GAA GCA  [120]
Japan (AY530089)       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [120]
South_Africa (AY69478) ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [120]
Argentina (DQ362947)   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [120]

Botucatu               GTA TCC ACA TTA GGA AAT GGT GTG CGG GTC  [150]
Japan (AY530089)       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [150]
South_Africa (AY69478) ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [150]
Argentina (DQ362947)   ... ... ... ... ..G ... ... ... ... ...  [150]

Botucatu               CTA GCC ACT GCA GTG AGA GAG CTA AAA GAA  [180]
Japan (AY530089)       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [180]
South_Africa (AY69478) ... ... ... ... ... ... ..A ... ... ...  [180]
Argentina (DQ362947)   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [180]

Botucatu               TTT GTG AGC AAA AAT CTG ACT AGT GCA ATC  [210]
Japan (AY530089)       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [210]
South_Africa (AY69478) ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [210]
Argentina (DQ362947)   ... ... ... ... ..C ... ... ... ... ...  [210]

Botucatu               AAC AGG AAC AAA TGT GAC ATT GCT GAT CTG  [240]
Japan (AY530089)       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [240]
South_Africa (AY69478) ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [240]
Argentina (DQ362947)   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [240]

Botucatu               AAG ATG GCT GTC AGC TTC AGT CAA TTC AAC  [270]
Japan (AY530089)       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [270]
South_Africa (AY69478) ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [270]
Argentina (DQ362947)   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [270]


Botucatu               AGA AGA TTT CTA AAT GTT GTG CGG CAG T [298]
Japan (AY530089)       ... ... ... ... ... ... ... ... ... . [298]
South_Africa (AY69478) ... ... ... ... ... ... ... ... ... . [298]
Argentina (DQ362947)   ... ... ... ... ... ... ... ... ... . [298]
```

Fig. 9: Seqüência de nucleotídeos do gene F do hMPV da amostra isolada neste trabalho e dos publicados anteriormente no GeneBank, alinhadas com o auxílio do programa ClustalX. Para facilitar a visualização das diferenças, posições conservadas entre a primeira seqüência e as demais foram substituídas por pontos.

4.9 *Análise dos fatores de risco envolvidos nas doenças*

4.9.1 *Vacinação*

Pode-se observar na tabela 3 a freqüência dos pacientes estudados, que foram vacinados contra gripe. Se compararmos a população total de idosos envolvidos no projeto de pesquisa realizado pelo Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina da UNESP (dados não mostrados) com a população que teve seu material clínico colhido para pesquisa de vírus (na presente pesquisa) verifica-se que dos 365 idosos investigados no total, 63,3% haviam tomado a vacina, mas esse percentual caiu para 55,32% na população de idosos com sintomas e que fora coletado material biológico.

	Núm. de amostras
Vacinados	26 (55,32%)
Não vacinados	13 (27,58%)
Sem informação	8 (17,1%)
Total	47 (100%)

Tab. 3: Estudo vacinal contra Influenza no ano 2002 da população estudada (n = 47).

4.9.2 *Idade*

A faixa etária dos pacientes analisados é apresentada na tabela 4.

Faixa etária	Núm.de pacientes
60 a 64	11
65 a 70	11
71 a 74	8
75 e mais	11
Sem Informação	6
Total	47

Tab. 4: Faixa etária (divididas em faixas de 5 anos) dos pacientes analisados (n = 47/ $\bar{\chi}$ = 70).

4.9.3 *Período de coleta*

Na figura 10 pode-se observar os meses em que as amostras foram coletadas. Nota-se que nos meses mais frios (junho e julho) o número de amostras coletadas foi maior que nos meses mais quentes. Nota-se também uma grande incidência no mês de novembro, que normalmente é um mês com temperaturas mais altas.

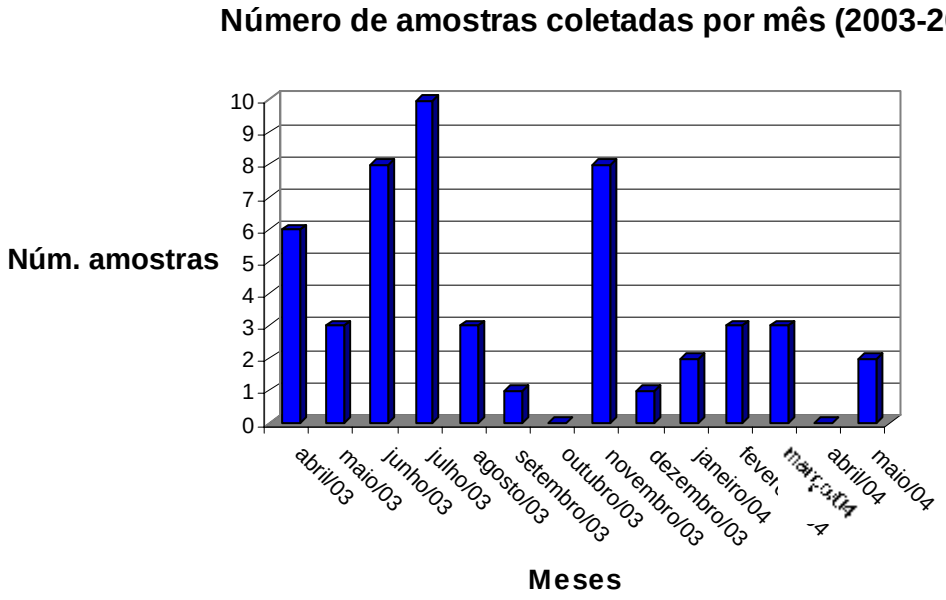


Fig. 10: Número de amostras (n=50) coletas X mês (abril de 2003 – maio de 2004).

4.9.4 *Tabagismo*

Na tabela 5 pode-se observar o número de fumantes na população estudada.

	Núm. de amostras
Não fumantes	32 (68%)
Fumantes	7 (14,9%)
Sem informação	8 (17,1%)
Total	47 (100%)

Tab. 5: Número de indivíduos fumantes na população estudada (n = 47).

4.9.5 *Sexo dos pacientes*

Na tabela 6 pode-se observar o sexo dos pacientes estudados.

4 **Sexo**	
Mulheres	Homens
33 (70,2%)	14 (29,8%)

Tab. 6: Total de homens e mulheres na população analisada (n = 47).

4.9.6 *Incidência de sintomas respiratórios mais comuns*

Na tabela 7 observam-se os sintomas respiratórios mais comuns apresentados pelos pacientes. A informação diz respeito a 29 dos 47pacientes, dos 18 pacientes restantes não havia informação sobre os sintomas. Mais de um sintoma pode ter sido referidos pelo mesmo paciente.

Sintomas	Total (n = 29)
Coriza	20 (69%)
Tosse	15 (51,7%)
Dor de garganta	18 (62,1%)
Mal-estar	13 (44,8%)
Cefaléia	12 (38,3%)

Tab. 7: Sintomas respiratórios mais comuns apresentados pelos pacientes estudados.

4.9.7 T*empo de coleta após o aparecimento dos sintomas*

Na tabela 8 pode-se observar o tempo entre o aparecimento dos sintomas e a coleta do material.

Tempo	Freqüência	Porcentagem
< 12 Hrs	4	13,80%
12 a 24 Hrs	1	3,45%
24 a 36 Hrs	10	34,48%
36 a 48 Hrs	8	27,59%
Sem informação	6	20,65%
Total	29	100,00%

Tab. 8: Tempo ,em horas, entre o aparecimento dos sintomas e a coleta do material (n = 29).

5. Discussão

Das 50 amostras analisadas nesse estudo, 50 (100%) foram negativas para o Vírus Influenza e o HRSV, e 1 (2%) foi positiva para o hMPV. Estes três vírus juntos são responsáveis por uma morbidade e mortalidade significante em idosos.

No mundo todo as infecções respiratórias constituem a principal causa de doenças agudas, sendo responsáveis por aproximadamente 4 milhões de mortes todos os anos[40]. As informações de ocorrência dos principais vírus respiratórios que causam doenças não é homogênea ao redor do mundo, incluindo o Brasil. Devido à falta de informação sobre a ocorrência e os fatores envolvidos nas doenças causadas por estes vírus, no Brasil, esse trabalho foi realizado.

Atualmente o Vírus Influenza e o HRSV são os patógenos mais comuns causadores de pneumonia viral em adultos idosos. Adicionalmente, a importância de outros vírus (como o Parainfluenza, Rinovírus, Coronavírus e hMPV) tem crescido substancialmente[41]Os testes diagnósticos como a PCR têm sido amplamente usados devido a rapidez e a confiabilidade. Esses foram os motivos principais da escolha desse método para realização deste trabalho.

Doenças crônicas como cardiopatias e diabetes parecem ser fatores de predisposição para infecção pelo Vírus Influenza, principalmente em idosos.

No estudo maior (365 idosos), e dos quais os 47 pacientes analisados nesse estudo faziam parte, a pesquisadora responsável encontrou uma taxa de 15,4% de diabéticos e 23,1% de cardiopatas. Nesse mesmo estudo de coorte foi descrito que a taxa de vacinação entre esses dois grupos foi praticamente igual a dos indivíduos sem problemas crônicos[73].

Complicações e mortes causadas por Influenza são muito preocupantes, particularmente em indivíduos com condições médicas de alto risco, principalmente idosos, crianças e adultos com problemas cardiovasculares e pulmonares[44]. Viroses contribuem substancialmente para uma porção de doenças respiratórias, incluindo pneumonia, em idosos.

Vírus respiratórios, particularmente o Vírus Influenza e o HRSV, são freqüentemente descritos como, iniciadores de problemas respiratórios agudos e cardíacos, em indivíduos fragilizados. Em estudos de idosos hospitalizados

devido a problemas cardiopulmonares agudos, a gripe ou doenças semelhantes a ela foram diagnosticados em 11% dos casos e o HRSV em 10%. Outros vírus respiratórios como os Rinovírus, Coronavírus e hMPV raramente são estudados para esses tipos de doenças, mas alguns estudos sugerem uma alta prevalência desses patógenos[67].

Os mecanismos pelos quais alguns vírus respiratórios tem mais facilidade de infectar indivíduos com problemas cardíacos não são bem claros. No entanto uma relação causal entre a infecção pelo Vírus Influenza e hospitalizações devido problemas respiratórios e cardíacos tem sido descrito em estudos de efetividade da vacina contra esse vírus, devido ao fato da imunização levar a uma queda do número de hospitalizações[67].

Indivíduos diabéticos constituem um grupo alvo para vacinação contra o Vírus Influenza desde a descoberta que esse grupo de pessoas podem desenvolver problemas sérios relacionados à gripe. A vacina contra o Influenza tem se mostrado capaz de produzir uma resposta imunológica adequada em sujeitos com diabete provendo uma redução efetiva na morbidade e mortalidade em pacientes com esse tipo de doença, e reduzindo também os números de hospitalizações entre os diabéticos durante epidemias de gripe[68].

A maior preocupação devido a presenças dessas duas doenças pode levar os idosos a uma maior e melhor atenção com a saúde. O que talvez interfira nas ocorrências de vírus respiratórios em tal população.

Reading (1998) demonstrou que ocorre um aumento de susceptibilidade à infecção pelo Vírus influenza em camundongos diabéticos. Os títulos virais aumentaram significativamente nos pulmões de camundongos diabéticos em comparação aos não diabéticos[69].

Em nosso estudo encontramos uma ocorrência de 2% do hMPV, o que está de acordo com os dados da literatura. Esses dados indicam uma ocorrência do hMPV de 1,7 a 2,9% em idosos saudáveis[34,41,45].

Em um estudo realizado em Rochester, Nova York, com adolescentes e idosos, o hMPV foi detectado por testes sorológicos e/ou PCR em 4,5% de todas as amostras analisadas. Entre os idosos o hMPV foi detectado em 1,7% das

amostras. Um dado interessante apresentado neste trabalho foi o achado de que 72% dos idosos analisados tiveram algum tipo de contato com crianças. Esse fato indica que as crianças podem exercer um importante papel como fonte de infecção de hMPV para idosos[34].

Interessantemente, evidências de infecções causadas por hMPV foram também encontradas em testes sorológicos, quase na mesma porcentagem (4,1%), em adultos assintomáticos, tornando mais complexa a questão sobre o papel do hMPV nas infecções agudas do trato respiratório em adultos[45].

Taxa de Vacinação

A taxa de vacinação nos pacientes desse estudo foi de 55,32%. Essa taxa é considerada boa do ponto de vista de imunização contra Influenza no Brasil. E pode estar relacionada à ausência de amostras positivas para o Vírus Influenza e para o HRSV.

A cobertura vacinal dos 365 idosos, das quais os 47 pacientes analisados faziam parte, foi de 63,3% [73]. Sabe-se que não é necessária uma cobertura vacinal de 100% para que haja uma diminuição da ocorrência do agente combatido. Essa taxa de vacinação pode ter prevenido uma parte significativa da população estudada contra o Vírus Influenza.

O vírus Influenza infecta cerca de 25-50 milhões de pessoas por ano nos EUA, levando a 150.000 hospitalizações e 30.000-40.000 mortes[40]. Mais de 80% dessas mortes ocorrem entre idosos. O comitê de práticas de imunização do Serviço de Saúde Pública americano recomenda que todas as pessoas com 65 anos ou mais, bem como as pessoas em condições de alto risco recebam a vacina anual contra gripe[46].

A vacina atual contra o Influenza é composta de vírus inativados. Essas vacinas previnem eficazmente contra as doenças relacionadas ao Influenza, o que leva a um alto benefício em termos de prevenção de hospitalizações e mortes, como mostrado em vários estudos de vacinação de idosos e indivíduos de alto risco[47].

Em países industrializados, epidemias anuais de Influenza infectam cerca de 5-15% da população. O risco de desenvolver complicações mais sérias é agravado em crianças pequenas e idosos. Dados coletados em Michigan (EUA) e Japão indicam que a vacinação em massa de crianças em idade escolar está relacionada com a redução das taxas de infecção respiratória em todas as idades, sugerindo que a imunização em larga escala das crianças pode afetar favoravelmente as epidemias de Influenza[40].

Nichol et al.[46] (1996) em um estudo que analisou três temporadas consecutivas de vacinação e a gripe (1990 até 1993), descreveu que a taxa de vacinação variou de 45 a 58%. No mesmo estudo os autores concluíram que a vacinação contra a gripe está associada com reduções significativas de visitas ao médico (17% devida a pneumonias e gripes, 6,4% devida a problemas respiratórios), hospitalizações (51,2%) e mortes devidas a todas as causas (45%).

Jefferson et al.[48] em uma metánalise realizada em 2005 encontrou uma efetividade da vacina (EV=1-risco relativo), em idosos de asilos, de 23% contra doenças semelhantes à gripe, 46% contra pneumonia, 45% de redução das hospitalizações e 42% de redução de mortes causadas por Influenza. Em idosos vivendo na comunidade a vacina obteve efetividade de 26% contra hospitalizações devidas ao Influenza e 42% de efetividade na prevenção de morte devida a várias causas.

O desenvolvimento de vacinas para prevenir a infecção por HRSV tem sido complicado pelo fato de que a resposta imune do hospedeiro parece desempenhar um papel na patogênese da doença. Estudos realizados na década de 60 mostram que crianças vacinadas com HRSV inativado por formalina, sofreram de doença mais severa depois de expostas ao vírus, em comparação aos não vacinados[40].

Embora as vacinas de vírus vivos atenuados serem preferíveis para imunização de recém nascidos, as vacinas de subunidades podem ser úteis para imunização de idosos e crianças de alto risco, bem como para imunização maternal. Uma vacina de subunidades baseada em proteína F purificada parece ser segura e também imunogênica para idosos[49 apud 40]. A combinação de vacina de vírus vivo atenuado com a vacina de subunidades tem sido considerada uma

boa promessa na proteção de adultos contra a doença causada por HRSV, embora testes preliminares, em adultos saudáveis e idosos, ainda serem inconclusivos[40].

Como já é de conhecimento público, a vacina contra gripe é eficaz no combate aos sintomas causados pelo Vírus Influenza. Em idosos, principalmente, essa proteção é muito importante, pois a maior taxa de mortes devida ao Influenza ocorre nesse grupo de pessoas. Existe também o fato de que a vacinação em massa de um grupo de indivíduos (principalmente crianças e idosos) pode prevenir uma grande parte da população em geral, contra a infecção do vírus.

Idade

Nesse estudo 40,5% dos idosos fazia parte do grupo em que a faixa etária era maior de 70 anos. Esse fato pode indicar uma maior atenção com problemas de saúde, incluindo a gripe, e sua prevenção. Esses cuidados podem ter influenciado a negatividade das amostras para o Vírus Influenza e o HRSV. Gutiérrez (2005) descreveu uma incidência de pneumonia de 45,2% para idosos acima de 65 anos e apenas 24,7% acima de 75 anos[74].

Donalísio[73] (2006), em um estudo sobre vacinação de idosos na cidade de Botucatu, relatou que a faixa etária entre 70 – 74 anos apresentou uma cobertura vacinal de 67,9% no ano de 2002. A faixa etária de 75 anos ou mais foi a que apresentou a melhor cobertura vacinal (≈ 90%)[73].

Com o avanço da idade a preocupação com a saúde geralmente aumenta também. As doenças relacionadas ao trato respiratório, como a pneumonia, estão entre as que mais merecem atenção e cuidados. Diversos trabalhos mostram que a faixa etária acima de 75 anos é a que possui a melhor taxa de cobertura vacinal. Essa informação pode indicar que idosos acima dessa idade possuem um maior cuidado com a saúde.

Período de coleta

Muitas amostras desse estudo foram coletadas em estações mais quentes (primavera e verão) e meses não muito frios (outono). As maiores incidências de Influenza, HRSV e Metapneumovírus são vistas principalmente no inverno e no início da primavera, enquanto o Rinovírus tem sua maior incidência na primavera e outono[42]. Monto (2002) no mesmo estudo mostrou a comparação entre a incidência de vários vírus respiratórios em Tecumseh, Michigan, durante os anos de 1966-1981. O autor encontrou uma ocorrência de 35% para o Rinovírus contra 30% para o Vírus Influenza e 11% para o HRSV[42].

Estudo baseado em comunidades, com amostras para isolamento viral, proveram ótimas informações sobre a etiologia das infecções do trato respiratório. Em um estudo realizado no nordeste brasileiro com crianças, na estação chuvosa (inverno), o Rinovírus foi encontrado em 45,6% das amostras positivas para vírus, seguido do Parainfluenza (16%), Enterovírus (15,8%), Adenovírus (9,9%) e Influenza (5,7%)[50].

Como 23 (46%) amostras foram coletadas nessas duas estações (primavera e outono) pode ter havido uma maior incidência de Rinovírus (não analisado nesse estudo) do que os vírus Influenza e HRSV. Ou seja, existe a possibilidade de os pacientes estudados terem referido sintomas de infecção por vírus respiratórios, mas esses sintomas podem ter sido causados por Rinovírus e não Influenza ou HRSV, já que esses três vírus respiratórios causam sintomas muito parecidos.

Tabagismo

A população estudada nesse trabalho apresentou uma baixa porcentagem de fumantes (14,9% / n = 47). A relação entre tabagismo e infecções causadas por vírus respiratórios parece ser direta, ou seja, o hábito de fumar parece aumentar a incidência de doenças respiratórias. Esse fato pode ter colaborado para uma baixa ocorrência dos vírus pesquisados.

Um importante fator de risco que pode agravar e até mesmo facilitar o desenvolvimento de um grande número de infecções respiratórias, provavelmente devido aos efeitos adversos nas defesas respiratórias, é o hábito de fumar. Fumantes estão mais propensos do que não fumantes a desenvolver resfriados, gripe, pneumonia e tuberculose, os quais tendem a ser mais severas[51].

Em um estudo realizado em 1993 Cohen et al.[52] analisaram 400 amostras de suspensão de vírus respiratórios e observaram que fumantes tem taxas maiores tanto de infecções virais quanto de resfriados em comparação a não fumantes.

Rogot e Murray[53] (1980) estudaram um grande número de militares veteranos e descobriram que fumantes tem 1,78 mais chance de morrer, devido a problemas respiratórios causados por vírus, do que não fumantes.

Em 1982 Kark et al.[54] em um estudo com militares israelenses descobriram que fumantes tem um risco aumentado de desenvolver gripe (razão de chance de 2,42), sendo essa mais severa. Finklea et al.[55APUD 45] em um estudo prospectivo realizado em 1969 com estudantes colegiais durante um episódio epidêmico de gripe descreveu que fumantes tem uma alta incidência de infecções devidas a esse vírus (detectados por título de anticorpos).

A taxa de fumantes em uma determinada população pode ser considerada como um indicador de problemas respiratórios. Portanto quanto maior o número de fumantes, maior a incidência de problemas respiratórios, incluindo problemas causados por vírus e outros agentes microbianos.

Sexo dos pacientes analisados

Dos 47 pacientes estudados, 33 (70,21%) eram do sexo feminino e 14 (29,79%) do sexo masculino. Essa diferença entre os sexos pode ter influenciado a ausência de amostras positivas para HRSV e Vírus Influenza na população estudada.

Iwane, M. K. et al.[56] em um estudo populacional realizado em 2006, baseado na prevalência de hopitalizações associadas com HRSV, Vírus Influenza

e Vírus Parainfluenza entre crianças, descreveu que as taxas globais de hospitalizações foram maiores para meninos do que para meninas.

Em um estudo publicado em 2001 sobre infecções virais respiratórias entre pacientes pediátricos em Taiwan, Tsai, H. et al.[57] encontrou uma taxa de infecção viral em meninos 1,4 vezes maior do que em meninas.

Chan, P. W. K., et al.[58] em um estudo realizado em 1999 sobre etiologia viral das infecções do trato respiratório inferior em crianças na Malásia descreveu uma taxa de infecção causada por vírus em meninos 1,6 vezes maior do que em meninas.

É possível que exista uma diferença na incidência de infecções virais respiratórias entre homens e mulheres. Dados encontrados na literatura indicam que existe uma maior incidência de problemas respiratórios causados por vírus na população masculina em relação à feminina.

Incidência de sintomas respiratórios mais comuns

Os principais sintomas causados pelo Vírus Influenza, HRSV e hMPV são muito parecidos entre si, com exceção de que o Influenza causa também um quadro febril. A tentativa de descobrir a etiologia viral baseado em sintomas clínicos é muito difícil, devido essa semelhança.

Uma grande variedade de agentes etiológicos pode estar associada aos quadros respiratórios virais. Entre os vírus mais relevantes estão: HRSV, o Parainfluenza, Rinovírus, Adenovírus, hMPV entre outros, além do vírus da influenza[70,71].

Kabra (2004) em um estudo sobre infecções do trato respiratório conclui que é difícil diferenciar infecções agudas do trato respiratório inferior de origem viral, de infecções do mesmo tipo de origem não viral, através somente de sinais clínicos[72].

No caso deste estudo essa semelhança entre os sintomas foi particularmente problemática, pois a coleta também dependia dos chamados dos idosos, caso esses começassem a sentir sintomas de quadros gripais. Pode ter ocorrido uma

confusão por parte dos pacientes, porque o chamado da equipe médica para coleta pode ter sido motivado por outros vírus que não os estudados (principalmente Rinovírus, Adenovírus, Coronavírus e Parainfluenza).

Tempo de coleta após o aparecimento dos sintomas

A OMS recomenda que a coleta das amostras para análise de vírus respiratórios seja feita em até 36 horas após o aparecimento dos sintomas. No caso do Vírus Influenza esse período pode ser de até 3 dias após o aparecimento. O diagnóstico dos vírus analisados fica prejudicado se a coleta for realizada após 5 dias, pois o título viral nas amostras cai significativamente após esse período.

Todas as amostras, com informação (n = 29), analisadas nesse trabalho foram coletadas dentro do período ideal, portanto o fator tempo de coleta provavelmente não influenciou a negatividade das amostras.

A soma dos fatores apresentados como vacinação, período de coleta, tabagismo, sexo dos pacientes e sintomas pode ter levado à ausência de amostras positivas para os vírus Influenza e HRSV.

De um modo geral, a população estudada parece estar em boas condições de saúde. Com o avanço da idade os cuidados com a saúde aumentam também. Esse maior cuidado parece influenciar a ocorrência de vírus respiratórios e as doenças causadas por esses agentes.

6. Conclusões

⇒ Não foram encontrados os vírus Influenza e HRSV na população estudada.

⇒ Diversos fatores como: vacinação, período de coleta, tabagismo, sexo dos pacientes, idade e tempo de coleta parecem ter influenciado a ausência de amostras positivas para tais vírus.

⇒ O gene do hMPV isolado foi idêntico aos já descritos na literatura.

7. Referências bibliográficas

1. Treanor J; Falsey A. Respiratory viral infections in the elderly. Antiviral research, 44: 79-102, 1999.

2. Waner JL. Detection of Respiratory Viruses: Is There a Need for Molecular Methods? Clin. Microbiol. Newsletter. 21: 10, 1999.

3. Morri JA; Bolunt RE. Recovery of cytopatogenic agents from chipanzees with coriza. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 9: 544-550, 1956.

4. Chanock RM; Raizman B; Myer R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chipanzee coriza agent (CCA). I. isolation, properties and characterization. Am. J. Hyg., 66: 281-290, 1957a.

5. Chanock RM; Kim HW; Vargosko A. J. Respiratory syncycial virus. I Virus recovery and other observations during 1960 outbreaks of brochiolits, pneumonia, and minor respiratory diseases in children. Am. J. Med. Assoc., 176: 647-653, 1961.

6. Suto RYT; Murray HGS; Chan RCK; Davies DP; French GL. Seasonal patterns of respiratory syncytial virus infections in Hong Kong: a preliminary report. J. Infect. Dis., 156: 527-528, 1987.

7. Chanock RM; Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chipanzee coriza agent (CCA). II Epidemiological aspects of infection in infants and young children. Am. J. Hyg., 66: 291-300, 1957b.

8. Collins PL; Mcintosh K & Chanock RM. 1996. Respiratory syncytial virus. In. Fields, B. N, DM Knipe; PM Howley; RM Chanock; JL Melnick; TP Monath; B Roizman; SE Strauss (eds.). “Fields Virology”, 3rd ed. Vol.1. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers, 1313-1351.

9. Mcintosh K; Chanock RM. 1990. Respiratory syncytial virus, p. 963-1047 In. B. N. Fields (ed.), Knipe, D. M., eds. Virology. Raven Press Ltd., New York.

10. Durigon EL; Takahashi VNVO; Soares BM; Botosso VF. Vírus respiratório sincicial humano – Revisão e levantamento dos dados Brasileiros. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas II (ICB II), Universidade de São Paulo, 1998.

11. Bertaimune L; Joncas J; Pavilanis V. Comparative structure, morphogenesis and biological characteristics of the respiratory syncytial vírus (RSV) and the pneumonia virus of mice (PMV). Arch. Ges. Virusforsch, 45: 39-51, 1974.

12. Kalica AR; Wright PF; Hetrick FM; Chanock RM. Electron microscopic studies of respiratory syncytial virus temperature sensitive mutants. Arch. Ges. Virusforsch, 43: 248-258, 1973.

13. Huang YT; Collins PL; Werts GW. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for a least seven mRNA species. J. Virol., 43: 150-157, 1982.

14. Lambert DM; Pons MW; Mbuy GN; Dorsch-Hasler K. Nucleic acids of respiratory syncytial virus. J. Virol., 36: 837-846, 1980.

15. Mcintosh K. & Chanock RM. 1990. Respiratory syncytial virus, p. 1045-1072. In. B. N. Fields (ed.), Virology. Raven Press Ltd., New York.

16. Filho AN; Rouquayrol MZ. Introdução à epidemiologia moderna. Rio de Janeiro, ABRASCO, 1990.

17. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico, 5(2): 6-9, 1993.

18. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology self-study programme. Atlanta: CDC, 1989.

19. Fundação Nacional de Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, FNS, 1998.

20. Foratini OP. Epidemiologia geral. São Paulo; EDUSP, 1976.

21. RCM. Infectologia pediátrica. Castellanos PL. Epidemiologia, saúde pública, situação de saúde e condições de vida: considerações conceituais. Atheneu, p. 181-192, 1993. Rio de Janeiro.

22. Vicente AN; Baldy JLS. et al. Doenças transmissíveis. 3ª ed., Sarvier; 2001. São Paulo.

23. Class ECJ; Sprenger MJW; Kleter GEM; et al. Type-specific identification of Influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 39: 1-13, 1992.

24. Kingsbury DW. *Paramyxoviridae* and their replication. In B. N. Fields, D. M. Knipe et. al. (eds.), Virology. Raven Press Ltd., New York, 2nd ed., 1990, p. 945-962.

25. Lamb RA; Kolakofsky D, Virion structure, chapter 41, In B. N. Fields, D. M. Knipe et. al. (eds.), Virology. Raven Press Ltd., New York, 2nd ed., 2001. Disponível em: http://pco.ovid.com/lrppco/index.html.

26. Lamb RA; Krug RM. *Orthomyxoviridae*: Their VirusTs and their Replication, chapter 46, In B. N. Fields, D. M. Knipe et. al. (eds.), Virology. Raven Press Ltd., New York, 2nd ed., 2001. Disponível em: http://pco.ovid.com/lrppco/index.html.

27. White DO; Fenner FJ. *Orthomyxoviridae*. Medical Virology. California:Academic Press, 1994. p. 491-493.

28. Marí JM; Gámez SS; Ruiz MP; Fraile MLR. Rapid detection of Respiratory Viruses by Shell Vial Assay Using Simultaneous Culture of Hep-2, LLC-MK2, and MDCK Cells in a Single Vial. J. Clin. Microbiol., 37:2346-2347, 1999.

29. Zhang W; Evans DH. Detection and identifivation of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods., 33: 165-189, 1991.

30. Van Den Hoogen BG; De Jong JC; et al. A newly discovery human metapneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat. Med 7(6): 719-24, 2001.

31. Stockton J; Stephenson I. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. Emerg. Infect Dis. 8(9): 897-901, 2002.

32. Willians JV; Harris PA; et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise halthy infants and children. N. Engl. J. Med. 350(5): 443-50, 2004.

33. Peret TC; Boivin G; et al. Characterization of human metapneumovirus isolated from patients in North America. J. Infect. Dis. 185(11): 1660-3, 2002.

34. Falsey A.R.; Eerdman D; et al. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. J. Infect. Dis. 187: 785-90, 2003.

35. Lamb RA; Kolakofsky D, *Paramyxoviridae*: The Viruses and their replication. In B. N. Fields, D. M. Knipe et. al. (eds.), Virology. Raven Press Ltd., New York, 2nd ed., 2001, p. 1305-1340.

36. Van Den Hoogen BG, Osterhaus DM; et al. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. Padiatr. Infect. Dis. J. 23(suppl. 1):S25-32, 2004.

37. Viazov SF; Ratjen F; et al. High prevalence of human metapneumovirus in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. J. Clin. Microbiol. 41(7): 3043-5, 2003.

38. Alvarez R; Harrod KS; et al. Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies. J. Virol. 78(24): 1403-11, 2004.

39. Vargas SO; Kozakewich HP; et al. Pathology of human metapneumovirus infection: insights in to the pathogenesis of newly identified respiratory virus. Pediatr. Dev. Pathol. 7(5): 478-86, 2004.

40. Girard MP; Cherian T; et al. A review of vaccine research and development: Human acute respiratory infections. Vaccine 23 (2005): 5708-24.

41. Falsey AR; Walsh EE. Viral pneumonia in older adults. Clin. Infect. Dis. 42(4): 518-24, 2006.

42. Monto AS. Epidemiology of viral respiratory infections. Am. J. Med. 112(6A): 4S-12S, 2002.

43. Blaine WB; Luby JP; Martin SM. Severe illness with Influenza B. Am. J. Med. 68: 181-9.

44. Barker WH; Mullooly JP. Impact of epidemic type A influenza in a defined adult population. Am. J. Epidemiol. 112(6): 798-813, 1980.

45. Hamelin M; Abed Y; Boivin G. Human metapneumovirus: A new player among respiratory viruses. Clin. Infect. Dis. 38(1 april): 983-90, 2004.

46. Nichol KL; Margolis KL; Wouremna J; et al. Effectiveness of Influenza vaccine in the elderly. Gerontology 42(5): 274-9, 1996.

47. Fukuda K; Cox NJ; Bridges CB; et al. Influenza vaccine-inactivated. Vaccines. 4th ed. USA: 339-70, 2004.

48. Jefferson D; Rivetti D; Rivetti A; et al. Efficacy and effectiveness of Influenza vaccines in elderly people: a systematic review. Lancet 366: 1165-74, 2005.

49. Durbin AP; Karron RA. Progress in the development of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. Clin. Infect. Dis. 37(12): 1668-77, 2003.

50. De Arruda E; Hayden FG; Macauliffe JF; et al. Acute respiratory virla infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. J. Infect. Dis. 164(2): 252-8, 1991.

51. Murin S; Bilello KS. Respiratory tract infections: Another reason not to smoke. Clev. Clin. J. Med. 72(10): 916-20, 2005.

52. Cohen S; Tyrrell DA; Russel MA; et al. Smoking, alcohol comsuption, and susceptibility to the commn cold. Am. J. Public Health. 83: 1277-1283, 1993.

53. Rogot E; Murray JL. Smoking and causes of death among U.S. veterans: 16 years of observation. Public Health Rep. 95: 213-222, 1980.

54. Kark JD; Lebiush M; Rannon NL. Cigarette smoking as a risk factor for epidemic Influenza A H1N1 in young men. N. Engl. J. Med. 307: 1042-1046, 1982.

55. Finklea JF; Sandifer SH; Smith DD. Cigarette smoking and epidemic Influenza. Am. J. Epidemiol. 90: 390-399, 1969.

56. Iwane MK; Edwards MK; Szilagyi PG; et al. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, Influenza virus and parainfluenza virus among young children. Pediatrics 113(6): 1758-1764, 2004.

57. Tsai HP; Kuo PH; Liu CC; et al. Respiratory Viral Infections among Pediatric Inpatients and Outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. J. Clin. Microbiol. 39(1): 111-118, 2001.

58. Chan PWK; Goh AYT; Kharullah NS; et al. Viral aetiology of lower respiratory tract infection in young Malaysian children. J. Paediatr. Child Health 35: 287-290, 1999.

59. Platzer C; Blankeinstein T. Polymerase chain reaction to quantitate cytokine mRNA. In: Blakiwill, F.R. (eds.). Cytokines: A pratical approach. Tokyo: IRL Press, 1997. p. 417.

60. Zheng H; Peret TCT; Randolph VB; et al. Strain-Specific Reverse Transcriptase PCR Assay: Means To Distinguish Candidate Vaccine from Wild-Type Strains of Respiratory Syncytial Virus. J. Clin. Microbiol. 34(2): 334-37, 1996.

61. Peret TC; Caroline BH; Hammond GW; et al. Circulation Patterns of Group A and B Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes in 5 Communities in North America. J. Infect. Dis. 181: 1891-6, 2000.

62. Peret TC; Caroline BH; Schnabel KC; et al. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. J. Gen. Virol. 79: 2221-9, 1998.

63. Mazulli T; Peret TC; Mcgeer A; et al. Molecular characterization of nosocomial outbreak of human resapiratory syncytial virus on an adult leukemia/lymphoma ward. J. Infect. Dis. 180(5): 1686-9, 1999.

64. Vigilância da gripe - dados e comentários [texto *on line*]. Disponível em <www.vigigripe.com.br>.

65. Influenza Vaccines. WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*, 2002, 77:230–238, and is available on the Internet at http://www.who.int/wer/pdf/2002/wer7728.pdf.

66. Falsey, A.R.; Hennessey, P.A.; Formica, M.A.; et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. N. Engl. J. Med. 352(17): 1749-59.

67. Carrat, F.; Leruez-Ville, M.; Tonnellier, M.; et al. A virological survey of patientes admitted to a critical care unit for acute cardiorespiratory failure. Intensive Care Med. 32:156-159, 2006.

68. García, R.J.; Montero, E.M.; Barrera, V.H.; et al. Influenza vaccination among diabetic adults. Diabetes Care 28(8): 2031-33, 2005.

69. Reading PC; Allison J; Crouch EC; Anders EM. Increased Susceptibility of Diabetic Mice to Influenza Virus Infection: Compromise of Collectin-Mediated Host Defense of the Lung by Glucose? J. Virol. 72(8): 6884-7, 1998.

70. Falsey AR; Cunningham CK, Baker WH; et al. Respiratory syncytial virus and Influenza A infections in the hospitalized elderly. J. Infect. Dis. 172(2): 518-27, 1995.

71. Nicholson KL; Silva LJ; Hemmersley V; Cancio E. Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: comparative, prospective, population based study of disease. BMJ 315(7115): 1060-4, 1997.

72. Kabra SK; Broor S; Lodha R; et al. Can we identify acute severe viral lower respiratory tract infection clinically? Ind. Ped. 41: 245-249, 2004.

73. Donalísio MR; Ruiz T; Cordeiro R. Factors associated with Influenza vaccination among elderly persons Southeastern Brazil. Rev. Saúde Pública 40(1): 115-9, 2006.

74. Gutiérrez F; Masiá M; Mirete C; et al. The influence of age and gender on the population-based incidence of community-acquired pneumonia caused by different microbial pathogens. J. Infec. 2006 (in press).