

Filipa Antunes Correia

**ESTUDO MOLECULAR DA EPIDEMIOLOGIA DA
INFECCÃO POR *RHINOVIRUS* NA REGIÃO DO GRANDE
PORTO**

Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011

Filipa Antunes Correia

**ESTUDO MOLECULAR DA EPIDEMIOLOGIA DA
INFECCÃO POR *RHINOVIRUS* NA REGIÃO DO GRANDE
PORTO**

Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011

Filipa Antunes Correia

**ESTUDO MOLECULAR DA EPIDEMIOLOGIA DA
INFECÇÃO POR *RHINOVIRUS* NA REGIÃO DO GRANDE
PORTO**

Assinatura:

Dissertação apresentada à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia Clínica.

RESUMO

As Rhinovirose são entre as causas mais frequentes de infecções agudas do trato respiratório em humanos, e estão geralmente associadas às constipações, o que representa, por si só, a causa mais relevante de absentismo escolar e laboral.

O presente estudo teve como objectivo estudar, pela primeira vez, num estudo longitudinal sistemático, a presença do *Rhinovirus* na narina de jovens voluntários saudáveis da região do Grande Porto.

O primeiro passo em direcção a essa meta, foi o desenvolvimento de um Semi-Nested-RT-PCR-em-Tempo-Real para a detecção do *Rhinovirus*. Contrariamente às nossas expectativas iniciais, a falta de um controlo positivo para o *Rhinovirus C* não nos permitiu desenvolver um protocolo específico para esta espécie viral, e os primers utilizados (descritos anteriormente por outros), não permitiram a detecção específica de *Enterovirus* (agora reclassificado no mesmo género que o *Rhinovirus*). No entanto, o protocolo desenvolvido é capaz de detectar *Rhinovirus A* e *B*, que são as espécies mais abundantes desses vírus. Para o estudo da epidemiologia da infecção por *Rhinovirus*, foram colhidas 248 zaragoas nasais entre Outubro de 2009 e Setembro de 2010 representando trinta e seis alunos voluntários da Universidade Fernando Pessoa. Por razões orçamentais, foram analisadas apenas 138 amostras representativas de dezassete voluntários para a presença do RNA de *Rhinovirus*.

O *Rhinovirus* foi detectado ao longo de todo o ano, mas apresentou-se significativamente mais frequente nos meses frios (Outubro a Março). Foi também encontrada uma relação significativa entre a presença do RNA de *Rhinovirus* e o número de sintomas apresentados pelos voluntários. Na verdade, o *Rhinovirus* foi encontrado com maior frequência em indivíduos que relatam a presença de pelo menos seis sintomas relacionados com a constipação do que indivíduos com menos sintomas. O estudo permitiu, também o acompanhamento dos voluntários durante todo o ano. Isto permitiu-nos demonstrar claramente que um indivíduo é repetidamente infectado durante este período. Os dados não incluem, até agora, a caracterização genética dos vírus envolvidos e, portanto, não podemos afirmar que essas reinfecções foram originadas pelo mesmo ou por um *Rhinovirus* diferente. No entanto, ficou claro que a resolução de uma infecção por *Rhinovirus* tem pouco efeito na duração do período em que os voluntários se mantêm livres de *Rhinovirus* no resto do ano.

Em conclusão, o presente estudo permitiu, pela primeira vez, o estudo sistemático de infecção por *Rhinovirus* em jovens voluntários saudáveis residentes na zona do Porto, mostrando que a infecção por *Rhinovirus* é de facto muito frequente e está associada (embora nem sempre) com o aumento de sintomas relacionadas com as constipações.

ABSTRACT

Rhinovirose are among the most frequent cause of acute upper respiratory tract infections in human, and are usually associated with the common cold, representing, per se, the single most relevant cause of school and work absenteeism.

In the present study, we aimed at studying, for the first time, in a systematic longitudinal study, the presence of *Rhinovirus* in the nostril of healthy young voluntaries from Oporto, Portugal.

As a first step towards that goal, we developed a Real-Time-Semi-Nested-RT-PCR for the detection of *Rhinovirus*. Contrary to what was our initial expectations, the lack of a *Rhinovirus* C control did not allow us to develop a specific protocol for this viral species, and the primers used (previously described by others) did not allow the specific detection of enteroviruses (now reclassified in the same genus as Rhinoviruses). However, the protocol developed is capable of detecting *Rhinovirus* A and B, which are the most abundant species of these viruses.

To study the epidemiology of *Rhinovirus* infection, two hundred and forty eight nasal swabs were collected between October 2009 and September 2010 from thirty six voluntary students of University Fernando Pessoa. For budged reasons, only one hundred and thirty eight samples representative of seventeen voluntaries were analyzed for the presence of *Rhinovirus* RNA.

Rhinovirose were detected throughout the year, but significantly more frequently in the cold months of October to March. The presence of *Rhinovirus* RNA was also found to be significantly related to the number of symptoms presented by the voluntaries. In fact, individuals reporting the presence of at least six symptoms related to common cold were found to harbor *Rhinovirus* most frequently than individuals with fewer symptoms.

The study design also allowed the follow-up of the volunteers throughout the year. This has allowed us to clearly demonstrate that one individual is repeatedly infected over a one year period. The data did not include, so far, the genetic characterization of the viruses involved, and thus we cannot state weather these reinfections are by the same or by a different *Rhinovirus*. Nevertheless, it became clear that resolution of a *Rhinovirus* infection has little effect in the duration of a *Rhinovirus* free status for the rest of the year.

In conclusion, the present study allowed, for the first time, the systematic study of *Rhinovirus* infection among Healthy Young individuals residing in the Oporto area, showing that *Rhinovirus* infection is indeed very frequent and is associated (albeit not always) with increased common cold related symptoms.

Ao meu avô Carlos, com saudades
e à minha avó Esmeralda pela força.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos os voluntários que participaram neste estudo, sem eles não seria possível a realização do mesmo; ao *National Institute for Health and Welfare* que amavelmente cedeu os controlos positivos de *Rhinovirus*; ao Ricardo pelo apoio prestado no laboratório; ao meu orientador, o Professor Doutor José Manuel Cabeda o meu muito obrigada pela grande aprendizagem que me têm proporcionado ao longo destes anos e por acreditar e me incentivar a evoluir.

Quero agradecer à minha família. Ao meu pai e à minha mãe, de quem tanto me orgulho, pelos valores com que me educaram, pela paciência, amizade e por acreditarem no meu trabalho. À minha irmã e à pequena Lua pela amizade e alegrias proporcionadas.

Quero agradecer a todos os meus amigos que me motivaram acreditando na concretização deste trabalho.

ÍNDICE

PARTE I - INTRODUÇÃO	15
1. PICORNAVIRUS	17
2. RHINOVIRUS	19
2.1. <i>Características gerais do Rhinovirus</i>	20
2.2. <i>Genoma</i>	20
2.3. <i>Ciclo de vida do Rhinovirus</i>	22
2.4. <i>Relação filogenética do Rhinovirus</i>	23
3. INFECÇÃO POR RHINOVIRUS	26
3.1. <i>Fisiopatologia da infecção por Rhinovirus</i>	26
3.2. <i>Exacerbação de outras patologias</i>	27
4. TRATAMENTO	30
5. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR RHINOVIRUS	32
5.1. <i>Colheita de amostras</i>	32
5.2. <i>Isolamento do vírus</i>	35
5.2.1. <i>Cultura celular</i>	35
5.3. <i>Serologia</i>	35
5.4. <i>Detecção antigénica</i>	36
5.5. <i>Detecção do RNA viral</i>	36
5.5.1. <i>Métodos baseados no PCR</i>	36
5.5.1.1. <i>PCR</i>	36
5.5.1.2. <i>RT-PCR</i>	39
5.5.1.3. <i>Nested-PCR</i>	41
5.5.1.4. <i>Multiplex PCR</i>	41
5.5.1.5. <i>PCR em Tempo Real</i>	42
5.5.1.5.1. <i>SYBR Green</i>	43
5.5.1.5.2. <i>Sondas de hibridação ou sondas FRET</i>	43
5.5.1.5.3. <i>Sondas Molecular Beacons</i>	44
5.5.1.5.4. <i>Sondas TaqMan</i>	45
5.5.2. <i>Hibridação in situ</i>	46
5.6. <i>Caracterização do vírus</i>	47
5.6.1. <i>RFLP</i>	47
5.6.2. <i>Sequenciação</i>	48
5.6.3. <i>PCR em Tempo Real</i>	50
6. OPTIMIZAÇÃO DO PCR	52
6.1. <i>Desenho dos primers e sondas</i>	52
6.2. <i>Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTPs)</i>	53
6.3. <i>Taq polimerase</i>	53
6.4. <i>Tampão</i>	53
6.5. <i>MgCl₂</i>	54

6.6.	<i>Ciclos: número, tempo e temperaturas nas diferentes fases</i>	54
7.	OBJECTIVOS	56
PARTE II -OPTIMIZAÇÃO DE UMA REACÇÃO DE PCR-EM-TEMPO-REAL PARA A		
	DETECCÃO DE <i>RHINOVIRUS</i>	58
1.	OBJECTIVO	59
2.	MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1.	<i>Amostras</i>	60
2.2.	<i>Extracção do RNA viral</i>	60
2.3.	<i>Seleccção dos primers</i>	61
3.	OPTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO	62
4.	RESULTADOS	65
5.	DISCUSSÃO	71
5.1.	<i>Optimização do RT-PCR</i>	71
5.2.	<i>Optimização do Semi-Nested-PCR</i>	73
5.3.	<i>Especificidade dos Primers</i>	74
6.	CONCLUSÃO	81
PARTE III - ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA INFECCÃO POR <i>RHINOVIRUS</i> EM		
	VOLUNTÁRIOS JOVENS SAUDÁVEIS	82
1.	OBJECTIVO	83
2.	MATERIAL E MÉTODOS	84
2.1.	<i>Amostras de Voluntários</i>	84
2.2.	<i>Controlos Positivos</i>	85
2.3.	<i>Extracção do RNA viral</i>	85
2.4.	<i>Amplificação</i>	86
2.5.	<i>Inquéritos</i>	86
2.6.	<i>Análise Estatística</i>	87
3.	RESULTADOS	88
3.1.	<i>Dados Pessoais</i>	88
3.2.	<i>Dados relativos a patologias/alergias descritas no inquérito</i>	89
3.3.	<i>Sazonalidade do Rhinovirus</i>	90
3.4.	<i>Sintomatologia</i>	92
3.5.	<i>Reinfecções</i>	96
3.6.	<i>Análise climatológica</i>	96
4.	DISCUSSÃO	100
5.	CONCLUSÃO	103
PARTE IV - CONCLUSÃO		
		104
PARTE V - BIBLIOGRAFIA		
		108
PARTE VI - ANEXOS		
		112

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Esquema representativo do genoma do <i>Rhinovirus</i>	18
Fig. 2	Imagem criada por computador da capsíde do picornavirus.....	19
Fig. 3	Genoma do <i>Rhinovirus</i> humano.....	21
Fig. 4	Arvore filogenética.....	25
Fig. 5	Amplificação exponencial que ocorre durante a reacção de PCR.....	37
Fig. 6	Primeiro passo do ciclo de PCR: Desnaturação.....	38
Fig. 7	Segundo passo do ciclo de PCR: Hibridação ou <i>annealing</i>	38
Fig. 8	Terceiro passo do ciclo de PCR: Extensão.....	39
Fig. 9	Detecção por <i>SYBR Green</i>	43
Fig. 10	Detecção por sondas de hibridação ou sondas FRET.....	44
Fig. 11	Detecção por sondas <i>Molecular beacons</i>	45
Fig. 12	Detecção por sondas <i>TaqMan</i>	46
Fig. 13	Curva de amplificação do ensaio inicial.....	66
Fig. 14	Análise da temperatura de <i>melting</i> do ensaio inicial.....	66
Fig. 15	Amplificação do ensaio otimizado e considerado ideal do RT-PCR.....	72
Fig. 16	Análise da temperatura de <i>melting</i> do ensaio otimizado e considerado ideal.....	72
Fig. 17	Amplificação do ensaio otimizado e considerado ideal do PCR Semi-nested.....	73
Fig. 18	Análise da temperatura de <i>melting</i> do ensaio otimizado para o PCR semi-nested.....	74
Fig. 19	Alinhamento de todas as sequências de <i>Rhinovirus</i> A disponíveis com os <i>primers</i> OS e OAS.....	76
Fig. 20	Alinhamento de todas as sequências de <i>Rhinovirus</i> B disponíveis com os <i>primers</i> OS e OAS.....	77
Fig. 21	Alinhamento de todas as sequências de <i>Rhinovirus</i> C disponíveis com os <i>primers</i> OS e OAS.....	77
Fig. 22	Alinhamento do genoma completo do Enterovirus A com os <i>primers</i> OS e OAS.....	77
Fig. 23	Alinhamento de todas as sequências de <i>Rhinovirus</i> A disponíveis com os <i>primers</i> OAS e IS RhvA_B.....	78
Fig. 24	Alinhamento de todas as sequências de <i>Rhinovirus</i> B disponíveis com o <i>primer</i> IS RhvA_B.....	79
Fig. 25	Alinhamento de todas as sequências de <i>Rhinovirus</i> C disponíveis com o <i>primer</i> IS Rhv HEV.....	79
Fig. 26	Alinhamento do genoma completo do Enterovirus A com os <i>primer</i> e IS RhvA_B.....	79
Fig. 27	Alinhamento dos <i>primers</i> IS HEV (392-410pb) e IS RhvA_B (390-410pb) com as sequências de <i>Rhinovirus</i> B disponíveis.....	80

Fig. 28	Distribuição da amostra por idades.....	88
Fig. 29	Distribuição da amostra quanto à presença de outras alergias.....	89
Fig. 30	Sazonalidade do <i>Rhinovirus</i>	90
Fig. 31	Sazonalidade da presença de <i>Rhinovirus</i> em cada indivíduo.....	91
Fig. 32	Correlação entre os sintomas manifestados no mês da colheita e as amostras positivas para <i>Rhinovirus</i>	93
Fig. 33	Correlação entre os sintomas manifestados no mês da colheita e no mês seguinte e das amostras positivas para <i>Rhinovirus</i>	93
Fig. 34	Frequência com que surem reinfecções por <i>Rhinovirus</i> , no mesmo indivíduo ao longo de um ano de “ <i>Follow-up</i> ”.....	96
Fig. 35	Presença de <i>Rhinovirus</i> para temperaturas médias mensais inferiores ou iguais a 13,9°C e superiores a 13,9°C.....	97
Fig. 36	Correlação da presença de <i>Rhinovirus</i> com as temperaturas mínimas absolutas.....	98
Fig. 37	Correlação da presença de <i>Rhinovirus</i> com as temperaturas máximas absolutas.....	99
Fig. 38	Correlação da presença de <i>Rhinovirus</i> com a temperatura média mensal.....	99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I -	Taxonomia dos Picornavirus em vigor desde 2009.....	17
Tabela II -	Estratégia terapêutica e potenciais compostos para o tratamento das infecções por Picornavirus.....	30
Tabela III -	Vírus encontrados em amostras de aspirados da nasofaringe e exsudados nasais.....	32
Tabela IV -	Detecção de vírus por aspirados, escovados, exsudados e lavagens nasais.....	34
Tabela V -	Sequência dos <i>primers</i> utilizados.....	61
Tabela VI -	Lista das condições testadas para a optimização do protocolo de amplificação do PCR1 com o kit da BioRad.....	63
Tabela VII -	Lista das condições testadas para a optimização do protocolo de amplificação do PCR 2.....	64
Tabela VIII -	Registo das diferentes variáveis testadas no RT-PCR e da melhor sensibilidade obtida para cada uma delas.....	67
Tabela IX -	Registo das diferentes variáveis testadas no RT-PCR e da melhor sensibilidade obtida para cada uma delas.....	69
Tabela X -	Condições seleccionadas para os dois ensaios que obtiveram maior sensibilidade.....	71
Tabela XI -	Distribuição da amostra por género.....	88
Tabela XII -	Distribuição da amostra quanto à presença de asma, alergia de pele, alergia alimentar, alergia a medicamentos e alergia a insectos.....	89
Tabela XIII -	Correlação entre os sintomas de indivíduos não alérgicos referentes ao mês em que foi realizada a colheita com a presença de <i>Rhinovirus</i> ou não nessas amostras.....	94
Tabela XIV -	Correlação entre os sintomas referentes a indivíduos não alérgicos do mês anterior e mês seguinte à realização da colheita e da presença e da presença de <i>Rhinovirus</i> ou não nessas amostras.....	95
Tabela XV -	Dados Climatológicos de 2009 e 2010.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

Å -	Ångström
BSA -	Albumina de soro bovino (do inglês: <i>Bovine Serum Albumine</i>)
cDNA -	DNA complementar (do inglês: <i>Complementary DNA</i>)
cm -	Centímetro
CPE -	Efeito Citopático (do inglês: <i>cytopathic effect</i>)
d -	Daltons (Da ou u)
DNA -	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP -	desoxinucleótidos trifosfatados (do inglês: <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
dsDNA -	DNA de cadeia dupla (do inglês: <i>double-stranded DNA</i>).
HRM -	Análise de <i>Melting</i> de Alta Resolução (do inglês: <i>High Resolution Melting</i>).
HRV -	<i>Rhinovirus</i> Humano (do inglês: <i>Human Rhinovirus</i>)
ICAM -	Molécula de adesão intracelular (do inglês: <i>Inter-Cellular Adhesion Molecule</i>)
ICTV -	Comité internacional de taxonomia de vírus (do inglês: <i>International Committee on Taxonomy of viruses</i>)
IgE -	Imunoglobulina E
IRES -	Local interno da entrada do Ribossoma (do inglês: <i>Internal Ribosome Entry Site</i>)
Kb -	Milhares de pares de bases
MgCl ₂ -	Cloreto de Magnésio
mRNA -	RNA mensageiro (do inglês: <i>messenger RNA</i>)
nm -	Nanómetro
ORF -	Sequência codificante (do inglês: <i>Open reading frame</i>)
PBS -	Tampão fosfato alcalino (do inglês: <i>Phosphate-buffered saline</i>).
PCR -	Reacção em cadeia da Polimerase (do inglês: <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
RNA -	Ácido ribonucleico (do inglês: <i>ribonucleic acid</i>)
RSV -	Vírus sincicial respiratório (do inglês: <i>Respiratory Syncytial Virus</i>)
RT-PCR -	Reacção em Cadeia da Polimerase – Transcrtase Reversa (do inglês: <i>Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction</i>)
SNPs -	Polimorfismos de nucleótido único (do inglês: <i>single nucleotide polymorphism</i>).
ssDNA -	DNA de cadeia simples (do inglês: <i>single-stranded DNA</i>).
T _m -	Temperatura de <i>melting</i>
UTR -	Região não transcrita (do inglês: <i>untranscription region</i>)

Parte I

Introdução

O *Rhinovirus* é responsável por metade das constipações anuais, sendo assim o maior causador de infecções do tracto respiratório em todas as idades (Peltola, 2008a). O pico de prevalência destas infecções ocorre de Setembro a Outubro e de Abril a Maio (Waris, 2008).

Em indivíduos imunocompetentes estas infecções são normalmente de baixa gravidade. No entanto, esta infecção pode ser acompanhada por otites médias nas crianças e pneumonias nos idosos. Em asmáticos e portadores de fibrose cística, a infecção por *Rhinovirus* pode desencadear reacções mais severas podendo ocasionar hospitalização (Peltola, 2008b). Mesmo nos casos de sintomatologia ligeira, as infecções por *Rhinovirus* têm um grande impacto sócio-económico já que, as populações mais afectadas são as crianças e idosos implicando o absentismo de adultos saudáveis para a prestação de cuidados (Peltola, 2008a).

Os *Rhinovirus* fazem parte de uma extensa família de pequenos vírus denominada de picornavirus.

1. Picornavirus

O picornavirus foi um dos primeiros vírus a ser identificado por Loeffler e Frosch na década de 1898. O nome Picornavirus pode dividir-se em três palavras: Pico-RNA-vírus que tendo origem no grego significa pequenos vírus de RNA (Semler, 2004). Inicialmente a sua classificação tinha como base as suas propriedades físicas (densidade das partículas e sensibilidade ao pH) e serológicas. Mais recentemente a sua classificação passou a basear-se na sua sequência nucleotídica (Semler, 2004). A revisão taxonómica mais recente (2009) reconhece 12 géneros dentro da família Picornavirus:

Tabela I – Taxonomia dos Picornavirus em vigor desde 2009^{a)}.

Género	Espécie
<i>Aphthovirus</i>	<i>Bovine rhinitis B virus</i> <i>Equine rhinitis A vírus</i> <i>Foot-and-mouth disease virus</i>
<i>Avihepatovirus</i>	<i>Duck hepatitis A vírus</i>
<i>Cardiovirus</i>	<i>Encephalomyocarditis vírus</i> <i>Theilovirus</i>
<i>Enterovirus</i>	<i>Bovine Enterovirus</i> <i>Human Enterovirus A</i> <i>Human Enterovirus B</i> <i>Human Enterovirus C</i> <i>Human Enterovirus D</i> <i>Human Rhinovirus A</i> <i>Human Rhinovirus B</i> <i>Human Rhinovirus C</i> <i>Porcine Enterovirus B</i> <i>Simian Enterovirus A</i>
<i>Erbovirus</i>	<i>Equine rhinitis B vírus</i>
<i>Hepatovirus</i>	<i>Hepatitis A vírus</i>
<i>Kobuvirus</i>	<i>Aichi virus</i> <i>Bovine kobuvirus</i>
<i>Parechovirus</i>	<i>Human parechovirus</i> <i>Ljungan vírus</i>
<i>Sapelovirus</i>	<i>Avian sapelovirus</i> <i>Porcine sapelovirus</i> <i>Simian sapelovirus</i>
<i>Senecavirus</i>	<i>Seneca Valley virus</i>
<i>Teschovirus</i>	<i>Porcine teschovirus</i>
<i>Tremovirus</i>	<i>Avian encephalomyelitis vírus</i>

a) A taxonomia viral actualizada pode ser consultada no site do Comité Internacional para a Taxonomia Viral (www.ictvonline.org).

O genoma do *Rhinovirus* é composto por uma molécula de RNA de sentido positivo com cerca de 7,2Kb. Em todos os Picornavirus é conservado um número de características (Semler, 2004):

- O RNA genómico é contagioso (característica das viroses de RNA de sentido positivo);
- Existência de uma região não transcrita (600-1200 bases) na região final 5' e uma curta região (50-100 bases) não transcrita na região 3' (Fig.1);
- A região não transcrita 5' contém uma estrutura secundária conhecida como IRES (*Internal Ribosome Entry Site*);
- O genoma codifica uma única poliproteína com cerca de 2100 a 2400 aminoácidos;
- Ambas as regiões terminais do genoma são modificadas, a região final 5' através de uma pequena ligação covalente a uma proteína VPg (~23 aminoácidos); e a região 3' através de uma poliadenilação (Fig.1);



Fig. 1 Esquema representativo do genoma do *Rhinovirus*.

A estrutura da cápside (figura 2) consiste num arranjo icosaédrico de 60 protómeros compactos. Cada um destes protómeros contém 4 polipetídeos, VP1, VP2, VP3 e VP4 (todos derivam da clivagem da proteína precursora original VP0). A cápside possui entre 27 a 30nm de diâmetro enquanto que o genoma possui aproximadamente 2,500nm e é hermeticamente empacotado no interior da cápside juntamente com iões de sódio ou potássio, ou poliaminas para neutralizar a carga negativa dos grupos fosfato (Semler, 2004).

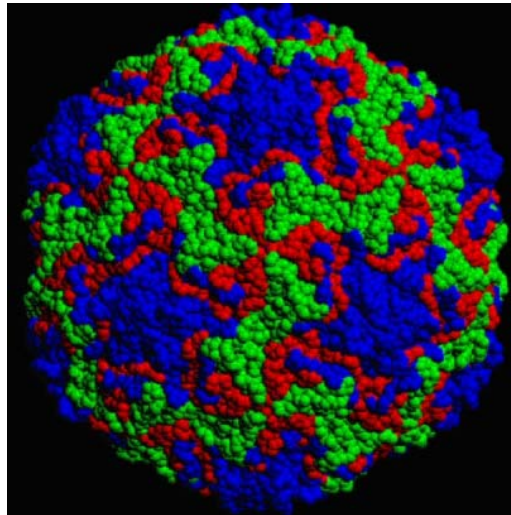


Fig. 2 Imagem criada por computador da cápside do picornavirus. A azul observa-se as VP1, a verde as VP2, a vermelho as VP3. No interior da partícula localizam-se as VP4 (não visíveis) (Semler, 2004).

2. *Rhinovirus*

O *Rhinovirus* é um vírus da família dos Picornavirus pertencente ao género *Enterovirus* (tabela 1).

As infecções causadas por *Rhinovirus* são a causa primária das frequentemente chamadas “constipações”, infecções agudas do tracto respiratório superior que podem também ocorrer no trato respiratório inferior tendo assim um contributo para a exacerbação de doenças respiratórias crónicas ou imunodeficiências (Nicole, 2009).

A fisiopatologia desta infecção não se encontra ainda bem esclarecida. Pensa-se que o *Rhinovirus* pode sobrestimular a resposta imune causando a sintomatologia associada à “constipação” e outras complicações médicas adjacentes (Nicole, 2009). O *Rhinovirus* parece também estar associado à inibição local da imunidade nos locais infectados por *Rhinovirus*, o que leva a um aumento da susceptibilidade a infecções secundárias por parte do hospedeiro tais como, bronquite, otite, sinusite e pneumonia, pelo que nestas infecções é frequente encontrar-se co-infecção pelo *Rhinovirus* (Semler, 2004).

2.1. Características gerais do *Rhinovirus*

Semelhante aos restantes picornavirus, o *Rhinovirus* é um vírus sem envelope com uma cápside composta de 60 placas proteicas, cada uma das quais formada por 4 proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4 (Lewis-Rogers, 2009). Cada uma das três proteínas externas – VP1, VP2 e VP3 possui uma massa molar de aproximadamente 30,000 Da e uma topologia de desdobraimento similar. Estes pequenos vírus de RNA icosaedral contém umas depressões na superfície da cápside que estão envolvidas na ligação aos receptores (Deuchler, 1993). Esta depressão da superfície, ou *canyon*, tem aproximadamente 12 Å de profundidade e tem entre 12 a 15 Å de largura, com o seu centro no vértice pentagonal. Os resíduos de superfície são mais variáveis nos locais de fixação dos anticorpos neutralizantes, já que os resíduos do *canyon* podem escapar à vigilância imunológica por impedimento físico, uma vez que os anticorpos são demasiado grandes para penetrar nesta região. Esta hipótese é apoiada pelo local alvo da mutagénese dos resíduos de revestimento do *canyon* que alteram a capacidade do vírus se ligar às membranas das células HeLa. Também mudanças conformacionais da base do *canyon*, produzidas por certos agentes virais que se ligam a uma bolsa na base do *canyon* inibem a ligação viral à membrana celular (Osion, 1993; Deuchler, 1993; Smith, 1993).

Foram classificados mais de 99 serotipos divididos de acordo com a sequência das proteínas da cápside, em 3 espécies diferentes *Rhinovirus* humano (HRV): HRV-A, HRV-B e HRV-C (tabela 1) (Cordey, 2008).

2.2. Genoma

O genoma do HRV (figura 3) possui aproximadamente 7200 pares de bases (pb) que podem ser divididos em quatro regiões diferentes: uma região (longa) não transcrita 5' (5'-UTR); uma única *open reading frame* (ORF); uma região (curta) não transcrita 3' (3'-UTR) e uma extremidade Poly(A).

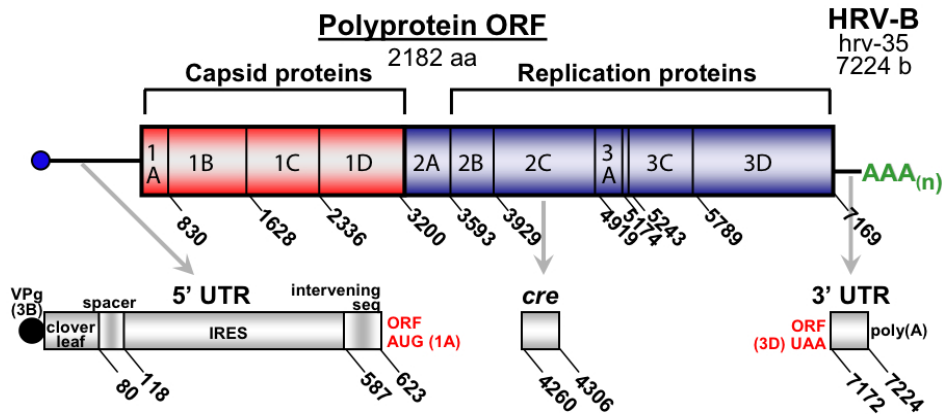


Fig. 3 Genoma do *Rhinovirus* humano (<http://www.international-Rhinovirus-consortium.org>).

As regiões 5'-UTR e 3'-UTR são conhecidas pelo seu conteúdo estrutural. A região 5' não traduzida contém dois elementos altamente conservados: o trevo final 5' (*cloverleaf*), que interage com a protease viral e proteínas celulares para formar um complexo ribonucleoprotéico que se encontra envolvido na mudança viral da tradução para a replicação; e o local interno para a entrada ribossomal (IRES) (Cordey, 2008). Neste domínio, existem ainda elementos de ação em *cis* e *trans* que intervêm na iniciação da síntese das cadeias negativa e positiva, respectivamente. Em contraste o IRES promove a iniciação da tradução do genoma viral. Quanto à zona 3' não transcrita nos picornavirus, encontra-se envolvida na eficiência da replicação do RNA viral, porém o seu mecanismo de funcionamento ainda não é conhecido (Cordey, 2008).

Os elementos de replicação de ação em *cis* (*cre*), foram identificadas nas zonas codificantes de diversos genomas de picornavirus (Cordey, 2008). O primeiro motivo *cre* foi identificado inicialmente na região codificante VP1 do HRV14 (membro da HRV-B). Elementos *cre* semelhantes foram descritos em diferentes picornavirus em diversas regiões do genoma nomeadamente no VP2 do *Mengovirus* bem como na VP1 de outros serotipos do *Rhinovirus* (Cordey, 2008). Com base na comparação de sequências e na análise mutacional dos elementos *cre* do *Enterovirus* e *Rhinovirus* foi identificado um motivo consensual para o segmento *loop* destes dois géneros. Foram realizados extensos estudos para compreender a função deste motivo *cre* na replicação do vírus. Quer as experiências *in vivo* como *in vitro* demonstraram claramente o

envolvimento do *cre* na uridilação da VPg. VPgpUpU é assumido como um *primer* para a polimerase viral 3Dpol na síntese de RNA. Não apenas o *loop* parece ser importante na função deste motivo *cre* mas também o tronco parece desempenhar um papel crucial. Uma vez que a VPg está ligada à zona final 5' da cadeia positiva e negativa do genoma é sugestivo que o motivo *cre* esteja envolvido na fisiologia de ambas as cadeias. Alguns estudos são controversos alegando que o papel dos motivos *cre* encontra-se envolvido apenas na síntese da cadeia de RNA positivo enquanto que outros demonstram um envolvimento do *cre* na síntese do RNA de sentido negativo. Mais surpreendente foram as observações de que as trocas de elementos heterólogos *cre* foram, em alguns casos permissivas sugerindo que o seu papel na replicação do RNA é, portanto, independente da sua localização no genoma (Cordey, 2008).

A maioria dos *Rhinovirus* humanos usam um de dois receptores para entrarem na célula. O principal grupo de *Rhinovirus* liga-se à proteína conhecida como ICAM-I (molécula de adesão intracelular-I), Os restantes *Rhinovirus* (cerca de 10%) usam uma proteína com aproximadamente 120Kb, membro das lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) cuja função não é ainda bem conhecida (Lewis-Roger, 2009; Deuchler, 1993).

2.3. Ciclo de vida do *Rhinovirus*

O primeiro passo no ciclo de vida do *Rhinovirus* é a sua ligação ao receptor de superfície celular (ICAM-1 ou LDLR). A ligação do vírus aos receptores celulares desencadeia alterações conformacionais da cápside do vírus levando à libertação do RNA viral dentro do citoplasma que ocorre por diferentes formas consoante o receptor viral a que este se liga (ICAM-1 ou LDLR) (Blomequist, 2004).

O ICAM-I pertence à superfamília das imunoglobulinas. Sendo uma glicoproteína transmembranar expressa em várias células, envolvida na resposta imunológica, é habitualmente referida como proteína de adesão celular (Lewis-Rogers, 2009).

Inicialmente é formada uma molécula de RNA com uma sequência de nucleótidos complementares usando como molde a cadeia positiva de RNA. A síntese desta cadeia complementar negativa é promovida pela proteína VPg e inicia-se a partir da zona

terminal 3'. Esta cadeia complementar é usada como molde na síntese do grande número de cópias do genoma viral que são usadas como RNA mensageiro (mRNA) para a tradução de mais proteínas virais ou no ciclo da infecção acondicionadas em novas partículas virais. Os vírus infecciosos criados são então agregados no citoplasma e depois libertados a partir da célula (Blomequist, 2004).

O genoma do vírus é traduzido no citoplasma celular originando proteínas virais essenciais para a replicação do genoma e produção de novas partículas virais. Primeiro o longo precursor da poliproteína divide-se em intermediários (P1, P2 e P3) através de duas proteinases. Por conseguinte, estas proteínas intermediárias vão originar uma série de proteínas virais Vp0, Vp1, Vp2, Vp3 e Vp4 que, por sua vez, juntamente com outras proteínas e com a RNA polimerase são necessárias para a replicação do genoma e síntese de mRNA (Blomequist, 2004).

2.4. Relação filogenética do *Rhinovirus*

No passado, os *Rhinovirus* foram classificados de acordo com a similaridade do seu padrão de reactividade serológica com uma biblioteca de 99 estirpes de referência que definiam os 99 serotipos virais padrão (Palmenberg, 2009).

Posteriormente, as 99 estirpes foram agrupadas em 2 grupos, de acordo com o seu perfil de sensibilidade a um painel de potenciais terapias (grupos 1 e 2 no anel externo da figura 4), bem como de acordo com o receptor utilizado: A maior parte dos serotipos virais utiliza a proteína celular ICAM-1 (Grupo M, Fig. 4), enquanto que uma pequena proporção das estirpes utiliza o receptor para LDL (grupo m, Fig. 4) (Palmenberg, 2009).

Posteriormente, estas estirpes foram agrupadas em duas espécies (HRVA com 74 serotipos e HRVB com 25 serotipos), em função da sequência parcial das regiões codificantes das proteínas da cápside (figura 4) (Palmenberg, 2009).

Recentemente, foi descrito um conjunto de novas sequências de *Rhinovirus* em doentes com patologias respiratórias do tipo *Influenza*, as quais apresentam sequências classificáveis como *Rhinovirus*, mas com divergências significativas relativamente às sequências das espécies de HRVA e HRVB. Isto levou o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) a classificá-los como uma nova espécie de *Rhinovirus* (RHV-C) na sua revisão da taxonomia viral de 2009. Note-se que estes vírus não foram nunca cultivados, mas a sequenciação integral do seu genoma está completa (Palmenberg, 2009).

Recentemente (Abril de 2009) foi publicada na *Science* a sequenciação integral de todas as estirpes conhecidas de *Rhinovirus*. Estes dados foram utilizados para estabelecer uma árvore filogenética dos vírus baseada na sua sequência total, bem como na provável estrutura secundária do genoma. Verificou-se neste estudo que a classificação filogenética baseada na sequência parcial das proteínas da cápside viral não produz resultados coincidentes com os obtidos com a sequência total, ainda que essa classificação tenha produzido com sucesso a divisão nas espécies virais correctas. Um bom exemplo de como a sequência completa (e a respectiva estrutura secundária) é importante consiste na descoberta de um conjunto de 3 estirpes classificadas como HRVA, mas que se apresentam claramente separadas de todas as restantes estirpes virais desta espécie (Clade D na figura 4, localizada na extremidade esquerda do agrupamento das estirpes HRVA). Nenhuma outra análise com sequências parciais apresentou esta divisão, a qual deriva da existência de uma separação em todo o genoma, bem como da presença de elementos replicativos *cis-acting*, zona 3'UTR e inserções/delecções locais atípicas relativamente a todas as restantes estirpes de HRVA. Por este motivo, os autores do artigo na *Science* propuseram de forma cautelosa a possível existência de uma quarta espécie viral (HRVD), a qual não foi ainda considerada pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Palmenberg, 2009).

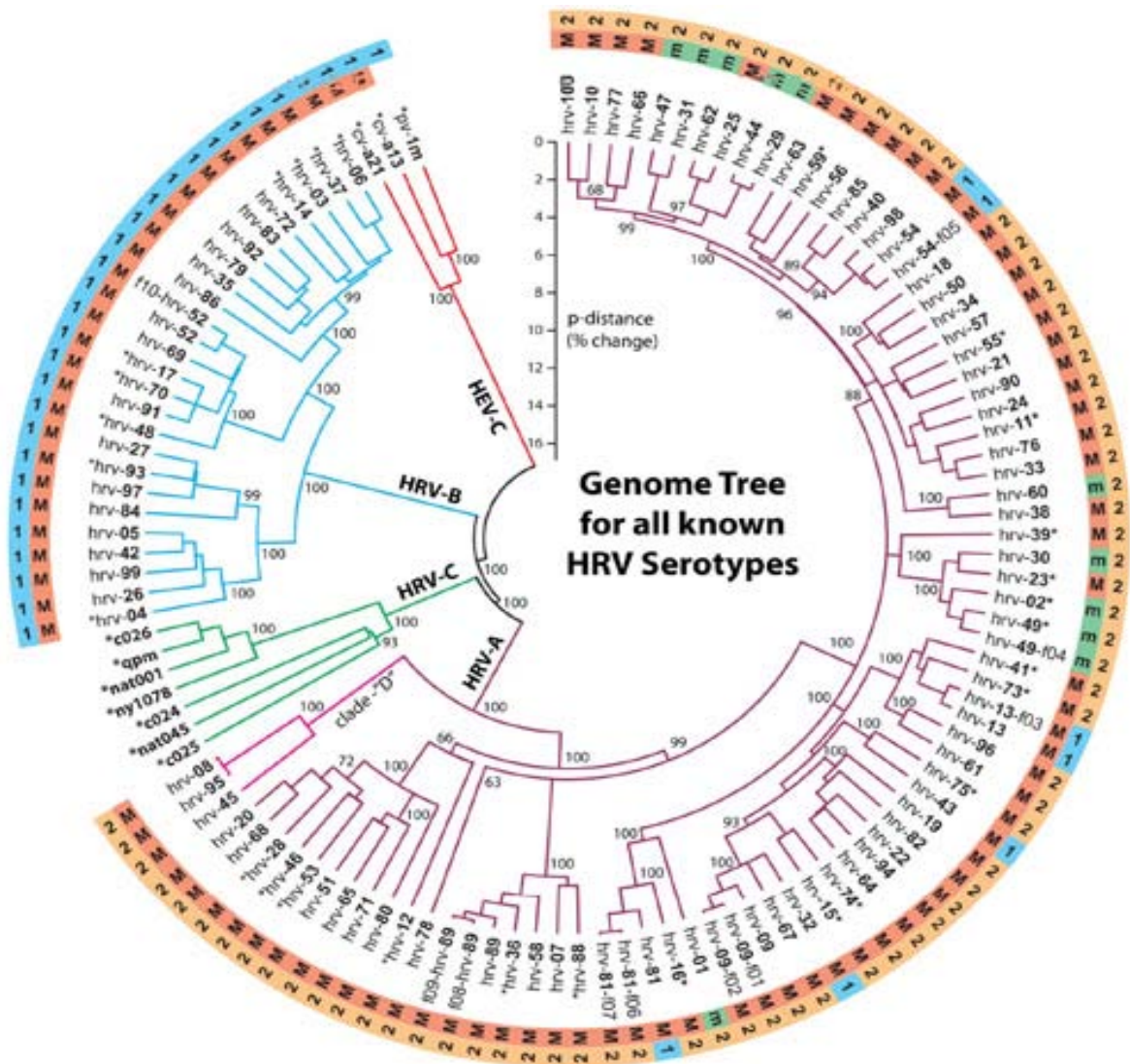


Fig. 4 Árvore filogenética. Relação entre todos os serótipos de HRV criados com base na sequência genómica completa (Palmenberg, 2009).

A árvore filogenética, apresentada na figura toma em consideração não apenas, todas as sequências genómicas completas conhecidas bem como, a sua estrutura secundária (por vezes, zonas sem homologia nucleotídica perfeita, apresentaram uma estrutura secundária sobreponível, pelo que foram consideradas funcionalmente relacionadas. O resultado, compatível com a informação serológica e clínica disponível, revelou que o HRV-A e o HRV-C mostram o mesmo ancestral comum que é de um grupo irmão do HRV-B (Palmenberg, 2009).

A disponibilidade da sequência completa dos genomas das várias estirpes de HRV permitiu ainda estudos teóricos sobre a possibilidade de recombinação viral. Os resultados que indicavam a existência de 23 cenários de recombinação possível

revelaram que ao contrário do que até então se supunha, a recombinação viral parece ser um mecanismo de geração de diversidade nos *Rhinovirus*, sugerindo que a coinfeção da mesma célula por diversas estirpes virais é um fenómeno que ocorre com alguma frequência. Dos locais de recombinação identificados, a maioria envolve a zona 5'UTR e os genes da cápside adjacentes. Não foram identificadas recombinações entre estirpes de espécies de *Rhinovirus* diferentes, mas o receptor utilizado para entrada viral (ICAM-1 ou LDLR) não parece ser um obstáculo à recombinação viral (Palmenberg, 2009).

3. Infecção por *Rhinovirus*

3.1. Fisiopatologia da infecção por *Rhinovirus*

O *Rhinovirus* pode ser transmitido através de aerossóis ou por contacto directo. A mucosa nasal é o primeiro sítio de inoculação do vírus, contudo a conjuntiva pode ser também envolvida em menor grau. O *Rhinovirus* liga-se ao epitélio nasal e cresce de forma localizada (Tolan, 2010).

O *Rhinovirus* tem como alvo as células epiteliais nasais. Quando em contacto com o nariz, uma baixa quantidade de vírus pode produzir infecção. O RNA do *Rhinovirus* tem sido detectado em elevada proporção nas células epiteliais nasais. Tem aumentado a evidencia de que as células epiteliais inferiores têm a mesma susceptibilidade que as células epiteliais do trato respiratório superior.

A temperatura óptima de crescimento do *Rhinovirus* varia entre os 33 e os 35°C e o seu período de incubação é de 2 a 4 dias (Tolan, 2010).

As secreções nasais têm apresentado concentrações de *Rhinovirus* mais elevadas que as secreções da faringe e saliva mostrando assim que, a replicação do vírus é aí mais eficiente (Blomequist, 2004).

A infecção respiratória superior aguda, vulgarmente conhecida por constipação é a doença predominante causada por *Rhinovirus*. Inicialmente, uma resposta inflamatória

ao vírus pode originar os seguintes sintomas: descarga nasal, congestão nasal, espirros e irritação da garganta. Os principais sintomas são dor de garganta, espirros, obstrução nasal e rinorreia. A duração média da doença é de sete dias em jovens adultos podendo ser superior a duas semanas em crianças e idosos (Blomequist, 2004).

Entre os dias 4 e 5 da doença a descarga nasal pode vir acompanhada de leucócitos polimorfonucleados que migraram do sítio da infecção em resposta a citocinas como a interleucina-8. Durante a fase da doença, a secreção de imunoglobulinas A e anticorpos estão envolvidas na resolução da doença bem como na protecção da reinfeção (Tolan, 2010).

Diversos tipos de *Rhinovirus* circulam na comunidade durante todo o ano contudo o pico de maior prevalência dá-se entre os meses de Setembro a Novembro e Abril a Maio. Também nas crianças é o *Rhinovirus* o agente mais comum de infecções do tracto respiratório superior (Peltola, 2008b).

O impacto do *Rhinovirus* na sociedade está associado à prestação de cuidados primários de saúde por profissionais de saúde, ao uso de medicamentos com e sem prescrição médica e à elevada taxa de absentismo de adultos nos seus postos de trabalho, e de crianças e jovens da escola. Este último absentismo é muitas vezes, acompanhado do absentismo de adultos para lhes prestarem cuidados básicos de saúde (Peltola, 2008b).

Em casos de hospitalização o *Rhinovirus* está muitas vezes presente em indivíduos com exacerbação aguda de asma, doença pulmonar obstrutiva crónica, infecções severas do tracto respiratório inferior em imunocomprometidos ou doenças cardiopulmonares (Peltola, 2008b).

3.2. Exacerbação de outras patologias

As complicações adjacentes à infecção por *Rhinovirus* não são incomuns, entre elas, podem ocorrer otite média, exacerbação aguda da asma, doença pulmonar obstrutiva crónica e exacerbação da fibrose cística (Loens, 2006).

Supõe-se que factores como a libertação de mediadores imunológicos, aumento da resposta aérea para as taquicininas, e o recrutamento e activação das células inflamatórias medeiam o aumento do reflexo broncoconstritor desencadeando assim a hiperreactividade das vias aéreas na infecção por *Rhinovirus* (Anzueto, 2003). A activação de células inflamatórias, libertação de mediadores imunológicos, aumento da resposta aérea às taquicininas e a mudança da classe IgE podem ter assim um papel importante nas mudanças do tracto respiratório inferior das populações infectadas com *Rhinovirus* (Anzueto, 2003).

Nas crianças e jovens, o vírus sincicial respiratório é na maior parte das vezes o agente das infecções do tracto respiratório superior, mas existem cada vez mais evidências que o *Rhinovirus* tem também um papel importante nas doenças do tracto respiratório inferior nesta população. O *Rhinovirus* espalha-se pelas vias respiratórias e infecta o epitélio do tracto respiratório inferior originando exacerbação da asma e fibrose cística (Anzueto, 2003).

Existem dados que sugerem que a infecção por *Rhinovirus* promove a exacerbação da asma e outras desordens do tracto respiratório inferior bem como o aumento dos processos inflamatórios locais nomeadamente em crianças. O *Rhinovirus* tem revelado um papel importante no aparecimento de ataques de asma nas crianças entre os 9 e 11 anos de idade. O agente viral da constipação, está presente em cerca de 80 a 85% das exacerbações da asma sendo o *Rhinovirus* o agente viral mais comum detectado nas crianças, detectando-se em 66% de vírus isolados. Outros estudos mostram a associação entre o *Rhinovirus* e a pieira da asma (Anzueto, 2003).

Nos adultos, o *Rhinovirus*, tem sido amplamente caracterizado como considerável causa de morbilidade e, em raras ocasiões, mortalidade especialmente em idosos (Anzueto, 2003).

Num estudo realizado em adultos durante 2 anos, foram documentadas constipações em 71% das exacerbações de asma e picos respiratórios deteriorados de doença respiratória com taxas de 27%. Nos casos em que o agente etiológico foi identificado o *Rhinovirus* encontrava-se presente em 57% das exacerbações da asma (Anzueto, 2003).

Estudos apontam também para o facto de pacientes com bronquite crónica serem mais susceptíveis a infecções por vírus respiratórios e que a sua recuperação é mais lenta do que em pacientes asmáticos (Anzueto, 2003).

Os surtos de *Rhinovirus* entre a população idosa quer na comunidade bem como em lares de idosos são causa importante de doenças respiratórias. Foi reportado um aumento da doença crónica em 40% de indivíduos com associação do *Rhinovirus* ao tracto respiratório e em 47% pelo facto de ser fumador. Por cada infecção por *Influenza* foram detectadas 6 de *Rhinovirus* indicando que o aparecimento de *Rhinovirus* na população idosa excede o aparecimento do vírus *Influenza* (Anzueto, 2003).

Estudos realizados em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crónica residentes em lares revelam que, dos surtos de *Rhinovirus* reportados nestes pacientes, 66% da população do estudo apresentava sintomas do tracto respiratório inferior e 52% desenvolveu novas anomalias na auscultação dos pulmões. Todos estes pacientes com doença pulmonar obstrutiva crónica mostraram ter doença mais severa e prolongada que a infecção por *Rhinovirus* isolada, com presença de sintomas durante aproximadamente 7,4 dias (Anzueto, 2003).

As infecções virais do tracto respiratório superior, são ocasionalmente, acompanhadas por infecções bacterianas secundárias dos seios nasais dificultando assim o diagnóstico entre sinusite bacteriana aguda e rinossinusite viral primária. As infecções por *Rhinovirus* podem originar inflamação nos seios paranasais e desencadear uma cascata de mecanismos de defesa. O agente pelo qual os vírus causam doença nos seios paranasais é desconhecido. A dificuldade de diferenciação de uma sinusite bacteriana, viral ou bacteriana/viral leva a sinusite a ser tratada comumente como sinusite bacteriana. Para determinação do agente causador de sinusite é necessária uma punção e aspiração dos seios paranasais porém, este procedimento não é feito rotineiramente (Anzueto, 2003).

4. Tratamento

Uma ampla variedade de agentes e mecanismos têm sido investigados para o tratamento e profilaxia das infecções por picornavirus. Os alvos dos fármacos de agentes virais incluem a susceptibilidade celular, ligação viral, inibidores de RNA, síntese da proteína viral e função da cápside (tabela 2) (Anzueto, 2003).

Tabela II – Estratégia terapêutica e potenciais compostos para o tratamento das infecções por Picornavirus.

Alvo viral	Classe do composto
Susceptibilidade celular	Interferão
Ligação viral	Anticorpos monoclonais; Tremacamra
Inibição RNA/replicação viral	Enviroxime
Síntese da proteína viral	Inibidor da protease 3C
Revestimento viral/função da capsíde	Inibidores da função da capsíde

O interferão tem como alvo a susceptibilidade celular. Tem um efeito antiviral, antiproliferativo e imunológico que tem impacto na susceptibilidade das células hospedeiras da infecção. Todos estes efeitos são mediados através de um receptor celular. O interferão é ainda um modulador imunológico, estimulando a eliminação da infecção por *Rhinovirus* (Anzueto, 2003).

A administração intranasal de interferão- $\alpha 2$ tem uma actividade profiláctica contra infecções naturais de *Rhinovirus* mas não se revelou benéfico no tratamento. Os efeitos colaterais como irritação nasal e sangramento limitam o seu uso. O tratamento prematuro, com interferão em infecções experimentais de *Rhinovirus* reduz os títulos virais e a pressão normal do ouvido médio. Os picos de sintomas são alterados ligeiramente. A combinação da administração intranasal de antivírus e droga anti-inflamatórias estão a ser investigadas e podem servir para reduzir as complicações das infecções por *Rhinovirus*, incluindo a sinusite e otite média (Anzueto, 2003).

Visto que cerca de 90% dos *Rhinovirus* usam o ICAM-1 para se ligarem à célula, foi testado também ICAM-1 solúvel para se ligar ao ligando viral, prevenindo assim a ligação viral à célula alvo. O composto solúvel ICAM-1 revelou ter uma eficácia

marginal em diversos estudos clínicos aleatórios pelo que o seu uso foi interrompido (Anzuetto, 2003).

A ligação viral é também usada como alvo de compostos usados no tratamento dos *Rhinovirus*. O uso de compostos que se ligam à cápside viral, bloqueiam a ligação do revestimento do vírus aos receptores celulares. Para os 90% dos vírus que usam o ICAM-I, estes compostos alteram a conformação do vírus, e previnem a sua ligação ao ICAM-I. Foram testados diversos compostos que revelaram ter uma actividade promissora em infecções experimentais de picornavirus mas apresentavam limitações no que diz respeito ao seu uso no tratamento de infecções respiratórias tais como, a dose, distribuição, tolerância, solubilidade, biodisponibilidade e segurança (Anzuetto, 2003).

De entre a classe de antivirais destaca-se o *Pleconaril* o qual apresenta biodisponibilidade se administrado oralmente para o tratamento de infecções por picornavirus. Em ensaios clínicos, o *Pleconaril* mostrou ter um impacto significativo na redução e duração dos sintomas da infecção por *Rhinovirus*. O *Pleconaril* integra-se na cavidade (*canyon*) da cápside viral para inibir a ligação do revestimento da cápside viral bloqueando assim a ligação aos receptores celulares inibindo a replicação viral (Anzuetto, 2003).

Foram também testados agentes inibidores de RNA como a Enviroxina. Este composto tem a sua potencial actividade na inibição da replicação dos *Rhinovirus* e *Enterovirus* inibindo a região codificada 3A do RNA viral. Estes estudos foram interrompidos devido à intolerância da dose oral e o limite da actividade antiviral depois da sua administração intranasal. Derivados deste composto encontram-se em estudo.

Várias drogas de baixo peso molecular foram sintetizadas para inibir a síntese da proteína viral, protease 3C revelando-se promissoras na actividade antiviral. O mais recente agente candidato que revela excelente actividade *in vitro* contra picornavirus e é bem tolerado é o AG7088. O composto intranasal encontra-se a ser reformulado para optimizar a concentração do composto activo para a cavidade nasal (Anzuetto, 2003).

5. Diagnóstico da infecção por *Rhinovirus*

5.1. Colheita de amostras

Os aspirados da nasofaringe ou as lavagens nasais são normalmente métodos de colheita de eleição para a detecção dos vírus respiratórios. A obtenção de um aspirado é desagradável e requer dispositivos de sucção apropriados para a colheita o que o torna desaconselhado para o uso de rotina na prática clínica. Por este motivo, a utilização de exsudados nasais com zaragatoas é benéfica. Um estudo realizado em crianças em meio hospitalar, todas com sinais e sintomas de infecção do tracto respiratório superior, procurou avaliar a utilidade do exsudado nasal para a detecção de uma vasta gama de vírus respiratórios, comparando com o aspirado da nasofaringe (Heikkinen, 2002).

O exsudado foi obtido introduzindo uma zaragatoa de algodão estéril na narina direita a uma profundidade de cerca de 2 a 3 cm. Depois de efectuada a colheita colocou-se a zaragatoa num meio de transporte viral. Para o aspirado da nasofaringe foi usado um catéter descartável ligado a um extractor de muco que foi introduzido a cerca de 5 a 7 cm de profundidade na narina esquerda onde foi efectuada uma lenta sucção com um dispositivo de sucção eléctrico. Após a sucção da secreção foi aplicada uma zaragatoa de algodão estéril na sucção e posteriormente colocada no meio de transporte viral. Ambas as amostras (exsudados e aspirados) foram transportadas para o laboratório no mesmo dia à temperatura ambiente e sujeitas a cultura viral por métodos de rotina. Os resultados obtidos estão descritos na tabela III (Heikkinen, 2002).

Tabela III – Vírus encontrados em amostras de aspirados da nasofaringe e exsudados nasais.

Vírus	Nº de amostras em que o vírus foi detectado por:			Nº total
	Ambos os métodos	Aspirado	Exsudado	
Vírus Sincicial Respiratório (RSV)	53	17	2	72
<i>Rhinovirus</i>	9	3	3	15
Vírus Influenza A ou B	11	1	0	12
Vírus Parainfluenza tipo 1,2 ou 3	7	1	1	9
Adenovirus	6	1	1	8
<i>Enterovirus</i>	4	1	2	7
Vírus Herpes Simplex	1	0	0	1
Total	91	24	9	124

Neste estudo participaram um total de 230 crianças com uma mediana de idades compreendida nos 10 meses em que 150 das crianças eram do sexo masculino. A causa viral da infecção do tracto respiratório foi determinada em 122 das 230 crianças tendo sido isolados 124 virus (Heikkinen, 2002).

Nos 124 virus isolados, 91 foram detectados por ambos os métodos: 24 foram detectados apenas por aspirados da nasofaringe e apenas 9 por exsudados nasais (Heikkinen, 2002).

Os resultados deste estudo indicam que a simples zaragatoa nasal proporciona uma amostra clínica com sensibilidade adequada para detecção de vários vírus respiratórios por cultura viral. Com excepção do vírus sincicial respiratório (RSV) os testes em que foram usados exsudados nasais detectaram todos os vírus em taxas comparáveis às taxas de detecção nos aspirados da nasofaringe. Pensa-se que pelo facto de o RSV ser um vírus relativamente instável, a quantidade de vírus activos seja inferior nos exsudados nasais do que nos aspirados da nasofaringe (Heikkinen, 2002).

Na selecção do melhor método de amostragem deve ter-se em conta não só o método de detecção, mas também as diferenças nas taxas de sucesso de detecção de cada um dos métodos de colheita; o desconforto que cada um dos métodos de colheita pode originar nos indivíduos; os custos que cada método de amostragem pode ter; a disponibilidade de instalações, de pessoas devidamente qualificadas para cada tipo de método e o tempo que é necessário disponibilizar nas diferentes colheitas (Spyridaki, 2009).

No que diz respeito à detecção viral pelo método de RT-PCR do *Rhinovirus* em amostras nasais um estudo compara os diferentes tipos de colheitas e as diferentes taxas de sucesso bem como o desconforto causado na colheita. Foram usados os seguintes métodos de colheita: aspirado nasal, escovagem nasal, exsudado nasal e lavagem nasal para a detecção de vários vírus respiratórios por RT-PCR nomeadamente o *Rhinovirus* (tabela IV) (Heikkinen, 2002).

Tabela IV – Detecção de vírus por aspirados, escovados, exsudados e lavagens nasais.

Vírus	% de detecção nos diferentes métodos de colheita			
	Aspirado	Escovagem	Exsudado	Lavagem
<i>Rhinovirus</i>	68	65	65	83
Adenovirus	40	33	20	27
Influenza	45	27	36	64
Coronavirus	83	83	100	100
Parainfluenza	100	100	100	100
Bocavirus	0	0	100	0
Outros vírus positivos	79	74	77	88

Como se pode verificar para a detecção de *Rhinovirus* o método que apresenta a percentagem de detecção mais elevada é o método de colheita por lavagem nasal. Porém, no mesmo estudo, foi realizada uma avaliação ao desconforto dos mesmos tipos de colheitas em que era usado um *score* de desconforto nos quais, *scores* mais elevados indicavam um maior nível de desconforto e vice-versa. Na avaliação do desconforto para os diferentes tipos de colheitas obtiveram-se os seguintes *scores*: aspirado nasal 2,68; escovagem 3,61; exsudados 2,54 e lavagem 2,63. Neste estudo o método de colheita por lavagem nasal apresenta as taxas mais elevadas de detecção viral com o menor desconforto em contraste com as escovagens nasais que, apresentam as taxas de detecção viral mais baixas e o maior nível de desconforto. Embora as taxas de detecção viral por aspirados e exsudados nasais sejam inferiores aos dos métodos de colheita por lavagem e, superiores aos métodos de colheita por escovagem, as diferenças não são significativas. Deve ter-se em conta que o método de colheita por exsudado nasal é o que revela ter menos custos e exige menos disponibilidade de recursos apresentando taxas de detecção virais face ao nível de desconforto muito satisfatórias (Spyridaki, 2009; Heikkinen, 2002).

5.2. Isolamento do vírus

5.2.1. Cultura celular

A detecção do *Rhinovirus* através de culturas de tecidos, nomeadamente por cultura celular é lenta e devido às condições específicas da cultura é cara, podendo limitar assim o diagnóstico (Heikkinen, 2002).

Frequentemente são usadas células HeLa ou fibroblastos de prepúcio de recém-nascido para isolamento do vírus. As diferentes linhagens celulares são mantidas em diferentes meios a um pH que pode variar entre os 7.0 e os 7.3 com uma temperatura de incubação de 33°C. O meio deve ser mudado todos os dias para minimizar efeitos tóxicos da amostra. O efeito citopático (CPE) da amostra na cultura é observado durante 6 dias. Quando as amostras revelarem um CPE negativo são armazenadas a -70°C e posteriormente confirmadas com outro tipo de métodos (RT-PCR). No caso das que apresentam um CPE positivo são sedimentadas e o sobrenadante é diluído e incubado durante 1 hora a 4°C a pH 7 e pH 3. Depois da neutralização do pH, os sobrenadantes são novamente colocados num meio fresco. O teste finaliza-se com o isolamento de rotina do vírus (Hyypiä, 1998).

A susceptibilidade do crescimento dos diferentes serotipos de *Rhinovirus* nas diferentes linhas celulares varia consideravelmente. O isolamento máximo é obtido com combinações de células pulmonares humanas e células HeLa escolhidas pela elevada expressão de ICAM-1 (Murray, 2007).

5.3. Serologia

A identificação serotípica do *Rhinovirus* pode ser obtida com soros hiper-ímmunes produzidos por diversas espécies de animais. Devido à grande diversidade de serotipos do *Rhinovirus*, a identificação é normalmente feita através de testes de microneutralização (Murray, 2007).

5.4. Detecção antigénica

A detecção antigénica é normalmente usada para detecção de outros vírus respiratórios pois o elevado número de serotipos de *Rhinovirus* dificulta o uso deste método no *Rhinovirus*. Apesar disso, existem estudos que descrevem a detecção do *Rhinovirus* através de testes de imunofluorescência usando soros policlonais em células HeLa Ohio (Blomequist, 2004; Murray, 2007).

As células são lavadas em PBS e fixadas em metanol-acetona a -20°C , secas à temperatura ambiente antes de serem incubadas a 37°C com o anticorpo. Depois de bem lavadas novamente em PBS, adiciona-se o anticorpo secundário fluorescente às células que serão novamente incubadas a 37°C no escuro. Depois de uma lavagem em PBS podem ser observadas ao microscópio de imunofluorescência (Tapparel, 2009).

5.5. Detecção do RNA viral

O primeiro RT-PCR de *Rhinovirus* foi realizado no final da década de 1980. A região onde os *primers* se ligam é altamente conservadora e reside na zona 5' não codificada.

5.5.1. Métodos baseados no PCR

5.5.1.1. PCR

A reacção em cadeia da polimerase (Polimerase-Chain-reaction ou PCR) é uma reacção que reproduz o processo fisiológico da replicação do DNA. Pode ser vista como uma reacção, segundo a qual uma molécula de DNA de cadeia dupla vai primeiro ser desnaturada, dando origem a duas moléculas de cadeia simples, e cada uma das moléculas de cadeia simples será copiada, obtendo-se no final duas moléculas de cadeia dupla. Tratando-se de uma reacção em cadeia, o produto obtido será de novo utilizado como reagente, sendo por isso amplificado de novo. Em cada ciclo da PCR obtêm-se teoricamente o dobro do DNA inicial, numa sequência geométrica ($2, 4, 8, \dots, 2^n$) em que n é o número de vezes que a reacção é repetida (Fig.5). Numa reacção de PCR

realizam-se habitualmente 35 ciclos, o que se traduz numa amplificação teórica superior a 34 mil milhões de vezes $2^{35} = 34,359,738,3689$ (figura 5). Na prática, as reacções de PCR apresentam uma eficiência inferior a 100%, pelo que a amplificação obtida será habitualmente inferior a este limite teórico (Cabeda, 2010).

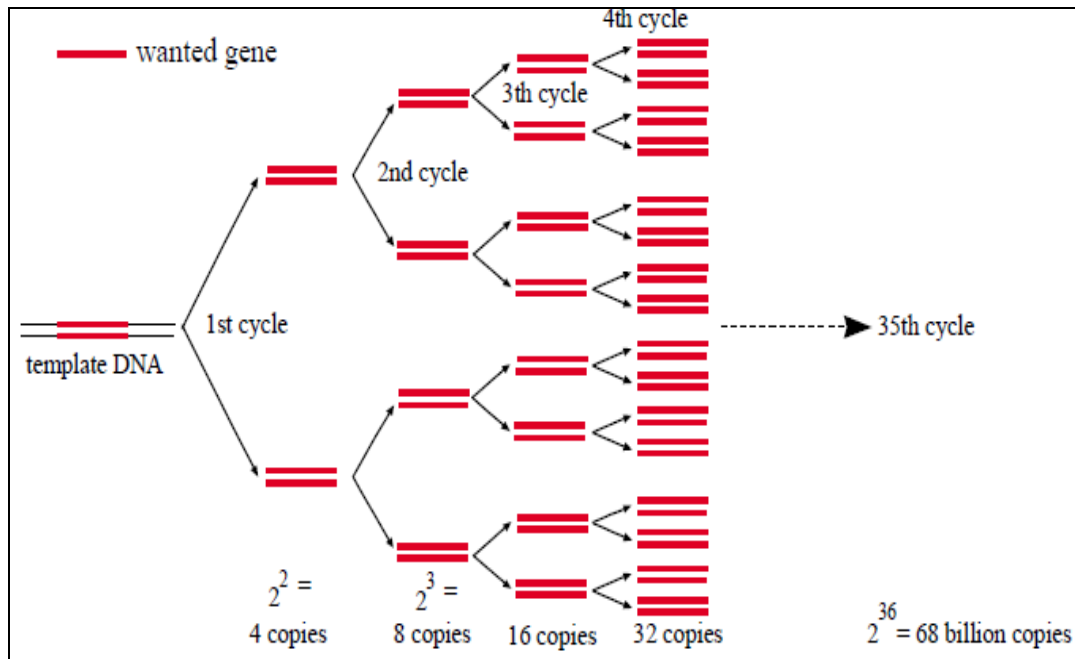


Fig. 5 Amplificação exponencial que ocorre durante a reacção de PCR.

A polimerase do DNA não é capaz de iniciar a síntese (ou polimerização) de DNA sem ter um iniciador ou *primer*, também ele uma pequena molécula de ácidos nucleicos (habitualmente DNA) de cadeia simples. Este *primer* é por isso desenhado e sintetizado para que a sua sequência seja complementar à da zona inicial a amplificar, fornecendo uma extremidade 3' livre para que sejam adicionados os nucleótidos relevantes pela polimerase. Como a molécula que estamos a amplificar é de cadeia dupla, cada cadeia terá o seu *primer*, sendo estes desenhados para serem complementares dos extremos da sequência alvo a amplificar em cada cadeia (ligando-se por complementaridade de bases) ficando as extremidades 3' viradas para o interior da sequência alvo (Cabeda 2010).

Pode dividir-se um ciclo da reacção da PCR em 3 fases distintas:

- A fase de desnaturação, na qual a molécula de DNA de cadeia dupla (dsDNA) é desnaturada, dando origem a duas moléculas de cadeia simples (ssDNA) (figura 6);

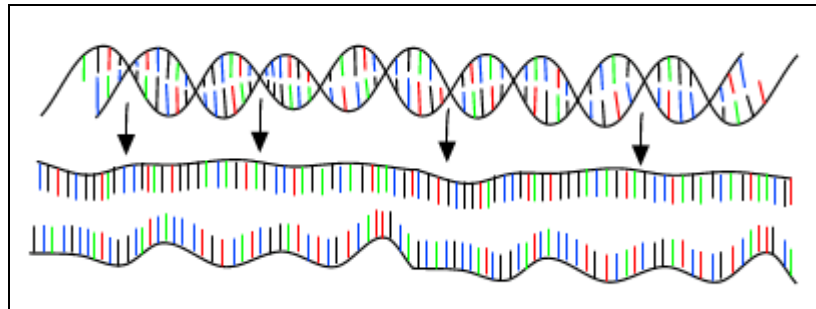


Fig. 6 Primeiro passo do ciclo de PCR: Desnaturação pelo calor. Ocorre a separação da dupla hélice de DNA em duas cadeias.

- Na fase de hibridação ou *annealing* os *primers* vão ligar-se por complementariedade de bases ao ssDNA (figura 7);

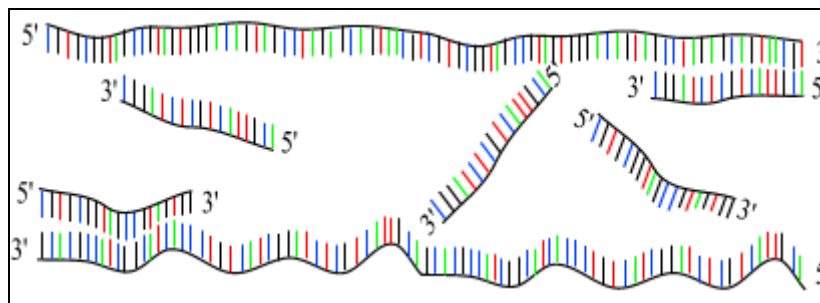


Fig. 7 Segundo passo do ciclo de PCR: hibridação (ou *annealing*) dos *primers* (55-65°C) por complementariedade às cadeias de DNA separadas

- Na fase de polimerização, a enzima DNA polimerase vai estender o *primer*, adicionando sucessivamente o nucleótido complementar da cadeia molde. No final desta fase são obtidas duas moléculas de dsDNA por cada molécula dsDNA molde inicial (figura 8).

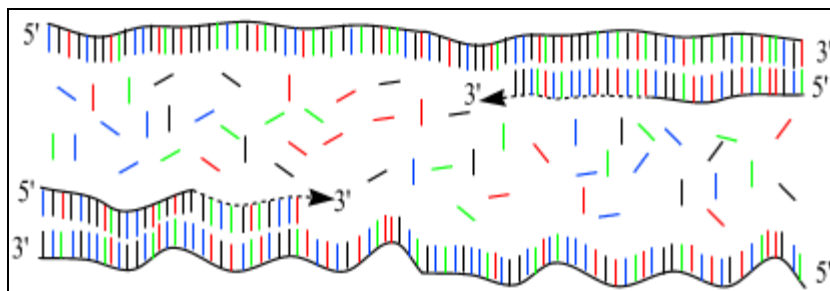


Fig. 8 Terceiro passo do ciclo de PCR: Extensão (72° C). A DNA polimerase reconhece o sítio de hibridação dos *primers* e liga-se a eles para os estender, provocando a réplica das cadeias de DNA

As temperaturas variam consoante cada fase do ciclo. Habitualmente a desnaturação do DNA ocorre a 94 - 95°C. Na hibridação ou *annealing* a temperatura pode variar entre os 50 e os 72°C sendo dependente dos *primers* que se usam. Na fase da polimerização a temperatura é estabelecida pela enzima que é usada na reacção, sendo hoje em dia utilizadas enzimas termoestáveis, permitindo assim a sua actividade mesmo sendo sujeitas a elevadas temperaturas na fase da desnaturação, o que acaba por conferir maior especificidade dos *primers* evitando a hibridação em zonas não específicas do genoma (Cabeda, 2010).

Para a reacção da PCR ocorrer além do DNA a estudar é necessário incluir também os *primers* específicos, dNTPs (desoxinucleótidos trifosfatados) uma DNA polimerase termoestável e o respectivo tampão que assegura as condições ideais de actividade da enzima utilizada. Um componente crítico deste tampão é o magnésio, habitualmente na forma de MgCl₂. A disponibilidade deste co-factor enzimático influencia a especificidade e sensibilidade, pelo que a sua concentração tem que ser cuidadosamente optimizada. (Cabeda, 2010)

5.5.1.2. RT-PCR

A reacção de RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*), é uma reacção de PCR realizada com DNA sintetizado por transcrição reversa a partir de RNA (cDNA). Nesta técnica podem usar-se duas polimerases de DNA diferentes, uma DNA polimerase dependente do RNA (transcriptase reversa) e depois uma DNA polimerase

dependente de DNA. Em alguns casos, é utilizada uma única enzima que possui ambas as actividades. (Cabeda, 2010)

Assim, a RT-PCR é um método enzimático *in vitro* para a amplificação de sequências de RNA. Pode ser usada para comparar a quantidade de mRNA em diferentes amostras populacionais, para caracterizar padrões de expressão de mRNA, para fazer a discriminação de mRNAs relacionados e para analisar a estrutura do RNA (Bustin, 2000).

O primeiro passo da reacção RT-PCR é a transcrição reversa do RNA. Esta transcrição é realizada através de transcriptases reversas e pode ser perturbada se o mRNA exibir extensa estrutura secundária, pelo que esta reacção por vezes ocorre em condições ligeiramente desnaturantes (Bustin, 2000).

As duas transcriptases reversas mais comuns são a do vírus da mieloblastose aviária (AMV-RT) e a transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). A AMV-RT é mais resistente que a MMLV-RT, pois mantém uma significativa actividade de polimerização acima dos 55°C podendo assim eliminar problemas associados à estrutura secundária do RNA. Num sentido inverso, a MMLV-RT, transcriptases reversas e suas derivadas têm uma menor quantidade de RNase H que a AMV-RT o que pode ter interferência na síntese de amplicões maiores. A MMLV-RT pode ser uma melhor opção de escolha quando o alvo a amplificar são moléculas de cDNA de maior comprimento (Bustin, 2000).

Na transcrição reversa podem ser usados *primers* específicos, *random examers* ou *primers* oligo-dT, a sua escolha envolve cuidadosas considerações. O uso de *primers* específicos de mRNA concentra a reacção no alvo pretendido, enquanto que o uso de *primers* *random* e oligo-dT alarga a diversidade de moléculas de mRNA que podem ser analisadas a partir de uma pequena amostra de RNA. A selecção dos *primers* pode provocar uma acentuada variação no número de cópias de mRNA, a selecção de *primers* *random hexamers* pode dar origem a um excesso de número de cópias de mRNA (Bustin, 2000).

Pode no entanto considerar-se conveniente o uso de apenas uma enzima realizando a RT-PCR apenas num passo. É então usada a *Thermus thermophilus* (Tth) polimerase, uma DNA polimerase com uma transcriptase reversa intrínseca, mas sem actividade de RNase H. Esta escolha pode ser vantajosa quando o RNA alvo contém extensas estruturas secundárias (Bustin, 2000).

Obtido o cDNA, todo o processo de amplificação ocorre de forma semelhante ao de uma reacção da PCR normal.

5.5.1.3. *Nested-PCR*

A reacção *Nested-PCR* é utilizada quando o PCR por si só não é suficiente para detectar o material genético alvo. Nesta reacção, utilizam-se os produtos da primeira reacção de PCR como fonte de DNA para uma segunda reacção realizada com novos reagentes. Esta segunda reacção deve ser realizada com *primers* diferentes da primeira, mais internos na sequência a amplificar, o que garante uma maior especificidade da reacção. Existem no entanto situações em que não sendo possível desenhar um segundo par de *primers* é necessário utilizar variantes do *Nested-PCR* que, embora frequentes, diminuem a especificidade da reacção: no *Semi-Nested-PCR* utiliza-se um dos *primers* da primeira reacção; e no *Pseudo-Nested-PCR* utilizam-se os dois *primers* da primeira reacção (Cabeda, 2010).

5.5.1.4. *Multiplex PCR*

A reacção PCR pode ser aplicada para amplificar vários alvos, bastando para isso dispor de vários pares de *primers*, específicos de vários alvos que tenham entre si temperaturas de *melting* (T_m) compatíveis. Este tipo de reacção é designado de *multiplex PCR*. Uma vez que o *multiplex PCR* produz múltiplas amplicões é necessário diferenciá-los. Quando os vários amplicões possuem tamanhos diferentes é frequente utilizar a electroforese para distinguir os diferentes amplicões produzidos nesta reacção. Quando tal não acontece recorre-se frequentemente a reacções de hibridação com sondas específicas ou, a análise das temperaturas de fusão de cada amplicão (Bustin, 2000).

Embora sejam investidos mais recursos na detecção de múltiplos alvos, quer em gastos de reagentes bem como na optimização da reacção *multiplex* que é à partida mais complexa pela diversidade de *primers* o diagnóstico detalhado e análises mais específicas são muitas vezes restritos pela disponibilidade limitada do material biológico (Bustin, 2000). A utilização da técnica *multiplex*-PCR torna-se vantajosa pela poupança de material biológico, de tempo e de reagentes (Cabeda, 2010).

Embora esta técnica apresente vantagens o seu sucesso não é simples de se obter. São necessários consideráveis cuidados no que diz respeito à optimização da reacção o que lhe confere algumas limitações (Bustin, 2000; Cabeda, 2010).

A eficácia da *Multiplex*-PCR é significativamente afectada pelo tempo de extensão e pelas concentrações de dNTPs, *primers* e MgCl₂. Frequentemente, quando a fase exponencial menos abundante de mRNA não se sobrepõe ao alvo, e os níveis de mRNA alvo são muito diferentes, a detecção e a quantificação, mesmo em tempo real podem representar também um problema. Na prática, se a quantificação exacta é o principal objectivo deve limitar-se a detecção por *multiplex* a dois ou três transcritos (Bustin, 2000; Cabeda, 2010).

5.5.1.5. PCR em Tempo Real

A técnica de PCR-em-Tempo-Real permite não só detectar a sequência alvo através da sua amplificação (como na técnica de PCR) bem como quantificar essa sequência. Este último facto torna-a útil não só para a detecção e avaliação do estágio de patologias bem como para a respectiva monitorização destas (Cabeda, 2010).

A diferença fundamental entre uma reacção de PCR e uma reacção de PCR-em-Tempo-Real é que a detecção da amplificação desta ultima técnica pode ser realizada em cada ciclo sendo o evoluir da reacção acompanhado do decorrer da mesma. O PCR convencional pode apenas fazer a detecção que é apenas realizada no final da reacção não havendo possibilidade de saber se a reacção está de facto a realizar-se ou mesmo se as amostras são positivas ou negativas (Cabeda, 2010).

Na reacção em PCR-em-Tempo-Real, é adicionado à mistura de reacção um composto fluorescente para que o produto da reacção possa ser determinado em tempo real. Esse composto fluorescente pode ser um fluorocromo ou uma sonda conjugada com um fluorocromo que através da fluorescência permite avaliar a concentração de produtos de PCR que será proporcional à fluorescência emitida pelo tubo de reacção (Cabeda, 2010).

5.5.1.5.1. *SYBR Green*

O formato de PCR em tempo real mais simples utiliza um corante específico do DNA em cadeia dupla – *SYBR Green*. Quando este corante está ligado ao DNA é excitável emitindo uma fluorescência proporcional à quantidade de amplificação formada (figura 9). O facto do *SYBR Green* se ligar a todo o DNA de cadeia dupla confere-lhe pouca especificidade pois pode ocorrer amplificação de fragmentos não específicos. Assim sendo, um bom desenho dos *primers*, adquire aqui um papel fundamental na especificidade dos fragmentos a amplificar, sendo ainda mandatória a confirmação da especificidade dos resultados com uma análise da temperatura de *melting* (T_m) (Wittwer C, 2003).

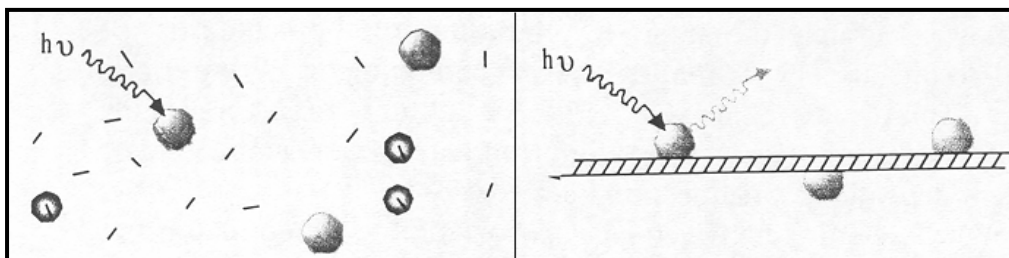


Fig. 9 Detecção por *SYBR Green*. Do lado esquerdo da figura encontra-se o corante específico do DNA – *SYBR Green* não ligado ao DNA e portanto não fluorescente. No lado direito observa-se a excitação do *SYBR Green* que se encontra já ligado ao DNA emitindo assim fluorescência detectável (Wittwer C, 2003).

5.5.1.5.2. Sondas de hibridação ou sondas *FRET*

Este tipo de sondas possui oligonucleótidos marcados na extremidade 5' com um fluorocromo dador que, ao ser excitado vai emitir energia. Esta energia é absorvida pelo fluorocromo repórter que se encontra na extremidade 3' do segundo oligonucleótido. Como este oligonucleótido hibrida muito próximo do

primeiro, os dois fluorocromos estão muito próximos um do outro o que torna esta transferência de energia possível. Na ausência de hibridação não ocorre a transferência de energia pelo que, a fluorescência do primeiro fluorocromo não é detectável (figura 10) (Reichl U, 2002).

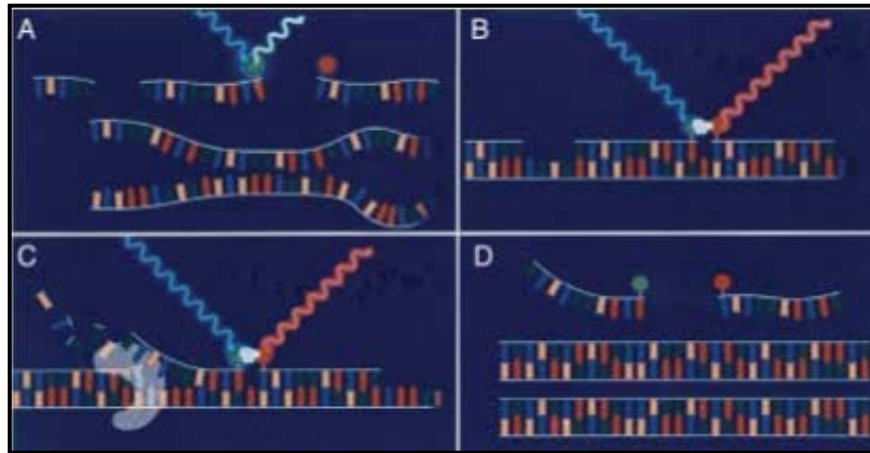


Fig. 10 Detecção por sondas de hibridação ou sondas FRET. (A) Desnaturação da dupla hélice do DNA. Duas sondas ainda livres a primeira marcada na extremidade 5' com um fluorocromo dador e a segunda marcada na extremidade 3' com um fluorocromo repórter. (B) Hibridação das sondas e consequente emissão de fluorescência pelo fluorocromo repórter. (C) Início da fase de polimerização. (D) Fim da fase de polimerização e libertação das duas sondas. (Reichl U, 2002).

5.5.1.5.3. Sondas Molecular *Beacons*

Este tipo de sondas assemelha-se com as sondas de hibridação ou *FRET*. Possuem uma molécula *quencher* na extremidade 5' e um repórter na 3' contudo apresentam uma estrutura secundária em forma de gancho de cabelo localizada na sequência da união com o DNA alvo específico (Roche, 2003).

Quando a sonda não se encontra hibridada, as extremidades encontram-se ligadas o que faz com que o *quencher* e o repórter se encontrem muito próximos impedindo a detecção de fluorescência emitida pelo *quencher* já que esta é absorvida pelo repórter.

Quando a sonda hibrida com o DNA alvo há uma abertura da sonda levando a um afastamento entre o *quencher* e repórter sendo assim possível detectar a fluorescência emitida pelo *quencher* (figura 11) (Reichl U, 2002; Roche, 2003).

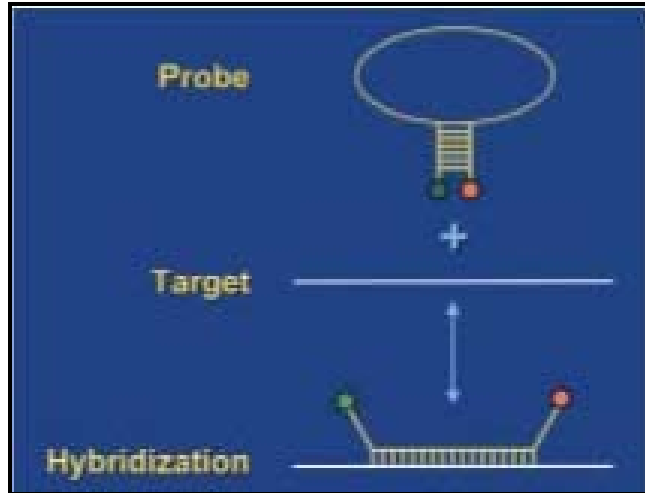


Fig. 11 Detecção por sondas *Molecular beacons*. Na parte superior da figura observa-se a sonda na conformação de auto-hibridação. Apresenta a forma de um gancho de cabelo e possui na extremidade 5' um *quencher* e na 3' um repórter que nesta conformação estão muito próximas. Deste modo o *quencher* não permite a fluorescência do repórter. Na parte inferior da figura observa-se a hibridação da sonda com o DNA levando a um afastamento entre o *quencher* e o repórter podendo assim a fluorescência emitida pelo *quencher* ser detectada (Reichl U, 2002).

5.5.1.5.4. Sondas TaqMan

Estas sondas possuem duas alterações diferentes nas duas extremidades. Um fluoróforo (repórter) na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3'. O *quencher* é capaz de absorver a luz que o fluoróforo emite impedindo assim a sua detecção.

Quando a sequência é amplificada, a actividade exonucleolítica da polimerase degrada a sonda, separando o *quencher* do fluorocromo, permitindo a detecção da fluorescência emitida pelo fluoróforo (figura 12) (Wittwer C, 2003).

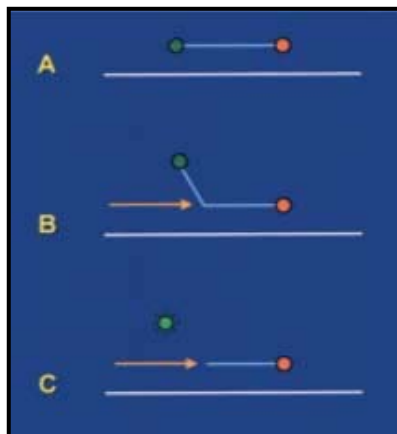


Fig. 12 Detecção por sondas *TaqMan*. (A) Sonda com um fluorocromo repórter na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3'. (B) Degradação da sonda por acção da TaqPolimerase e consequente (C) separação entre o *quencher* e o repórter (Reichl U, 2002).

5.5.2. Hibridação *in situ*

A hibridação *in situ* tem como finalidade a formação de híbridos sequencialmente complementares (DNA-DNA, RNA-RNA e DNA-RNA). Esta complementariedade pode ser perfeita ou tolerar algumas bases não complementares. A temperatura de fusão também conhecida como temperatura de *melting* é a temperatura à qual metade das moléculas de uma dada espécie de dsDNA ou dsRNA se encontram em cadeia simples, corresponde então à temperatura à qual se está a fornecer energia suficiente para romper as ligações de hidrogénio estabelecidas na hibridação por emparelhamento perfeito. A especificidade de uma hibridação depende então da temperatura de fusão a que esta ocorre. Se a temperatura foi inferior à de fusão vai favorecer a inespecificidade da reacção com o emparelhamento não específico de sequências não homólogas aumentando a eficiência da reacção. As temperaturas muito acima da temperatura de fusão diminuem a eficiência da hibridação com aumento da sua especificidade (Cabeda, 2010).

A hibridação é frequentemente utilizada para testar a presença de uma sequência específica através da utilização de sondas de DNA ou de RNA. As sondas são moléculas de ssDNA ou ssRNA com uma sequência complementar da sequência alvo de cadeia simples. Contudo em alguns casos, podem usar-se moléculas de cadeia dupla

como fonte da sonda por exemplo os produtos de PCR, previamente submetidos a uma desnaturação antes da sua utilização.

Quanto maior a sonda, maior é a garantia de que a sua hibridação só ocorre com a sequência em estudo, porém, quando se utilizam sondas de menor dimensão é necessário efectuar um estudo de especificidade da sonda, dada a possibilidade de existirem sequências iguais ou semelhantes noutros genomas ou noutros genes do organismo em estudo (Cabeda, 2010).

Após estabelecidas as condições adequadas para a hibridação da sonda é necessário que a sonda seja detectada. Habitualmente, esta detecção faz-se através da imobilização da sonda num suporte sólido e visualização desta através de uma marcação química. Existem várias marcações químicas possíveis que se usam nesta detecção, marcação com radioisótopos, por quimioluminescência, fluorescência ou mesmo com polimerases do DNA (Cabeda, 2010).

5.6. Caracterização do vírus

5.6.1. RFLP

A técnica de RFLP baseia-se na hidrólise do DNA com endonucleases de restrição seguida da separação dos fragmentos gerados por electroforese. Estes fragmentos correspondem a padrões de restrição específicos (Cabeda, 2010).

As enzimas de restrição cortam as sequências de DNA através do reconhecimento de sequências nucleotídicas específicas identificando assim os fragmentos de DNA que incluem zonas de polimorfismos/mutações (Cabeda, 2010).

A técnica de RFLP é então aplicada logo após a realização do PCR (que amplifica o fragmento de ácido nucleico específico) seguida de uma reacção de restrição com uma endonuclease de restrição e o resultado é analisado por electroforese. A detecção do

alvo é determinada pela selecção da enzima de restrição que ou reconhece a sequência alvo ou a restante sequência, nunca as duas (Cabeda, 2010).

5.6.2. Sequenciação

A sequenciação revolucionou os sistemas de classificação de organismos, usada em especial para a taxonomia viral.

O método de sequenciação de DNA consiste numa série de técnicas bioquímicas que têm por objectivo determinar a ordem das bases de uma molécula de DNA. Entre estas técnicas bioquímicas destaca-se o método de sequenciação de *Sanger*, o mais utilizado de todos os métodos de sequenciação. Adicionalmente, é possível fazer a associação de dados fenotípicos com sequências genotípicas, o que permite identificar inequivocamente, mesmo fragmentos muito pequenos de DNA a fenótipos biológicos (Men, 2008).

O método de *Sanger* é um método enzimático que usa uma reacção simples de polimerização. Neste método é necessário conhecer a sequência 5' da zona a sequenciar para que seja possível desenhar um *primer* complementar da cadeia a sequenciar. Através da hibridação do *primer* a esta zona, este fornece então a necessária extremidade 3' livre. A reacção prossegue com a incorporação sucessiva de nucleótidos até que o nucleótido incorporado seja um terminador (Men, 2008).

Os terminadores são nucleótidos que não possuem grupo hidroxilo no carbono 3, o que não permite a ligação ao nucleótido seguinte, terminando assim a polimerização. Existem terminadores diferentes, capazes de, por complementariedade, reconhecer os respectivos nucleótidos (Cabeda, 2010; Men, 2008).

Os produtos da reacção de sequenciação de *Sanger* necessitam então de ser resolvidos segundo o seu peso molecular em géis de grande resolução (géis de poliacrilamida) ou em electroforese capilar. Pode usar-se apenas uma espécie de terminador que em cada reacção irá revelar a posição do respectivo nucleótido. A electroforese das várias

reações, usando os diferentes terminadores, permite obter um gel de sequenciação clássico que se lê seguindo os produtos com peso molecular sucessivamente crescentes (Cabeda, 2010; Men, 2008).

A adição de diferentes fluorocromos aos diferentes terminadores facilita a leitura dos géis de sequenciação tornando mais precisas as diferenças de migração em gel. Assim sendo, cada produto de PCR num terminador específico emite luz num comprimento de onda específico. Com a realização de todas as reações num só tubo, correndo todos os produtos numa só *lane* do gel é necessário a utilização de aparelhos específicos capazes de analisar os diferentes comprimentos de onda emitidos (Cabeda, 2010; Men, 2008).

Esta sequenciação pode ser efectuada directamente por PCR uma vez que a amplificação do material genético e a especificidade do produto a sequenciar podem ser conseguidas com recurso a uma reacção de PCR convencional. A sequenciação directa por PCR tem início com um PCR que amplifica a zona alvo através da selecção de *primers* específicos. A esta reacção chama-se PCR simétrico, pois amplifica ambas as cadeias do dsDNA original de igual forma. Seguem-se mais duas reacções de PCR em paralelo denominadas de PCR assimétrico. Cada uma destas reacções utiliza apenas um dos *primers* iniciais o que faz com que em cada reacção seja amplificado apenas uma das cadeias do DNA alvo. Estas reacções de PCR assimétricas são assim reacções de sequenciação de *Sanger* sendo para tal necessário adicionar na mistura de reacção os terminadores ainda que, em menor concentração que os restantes nucleótidos (Cabeda, 2010; Men, 2008).

A utilização de equipamentos de electroforese capilar para a resolução dos produtos de sequenciação têm vindo a tornar-se técnica de eleição dada a sua maior capacidade de resolução, reprodutibilidade, capacidade de automatização e a sua menor exigência tecnológica ao nível dos detectores. Uma desvantagem do uso desta técnica é o elevado custo dos equipamentos de electroforese. Um exemplo de equipamento frequentemente utilizado é o sequenciador ABI (Cabeda, 2010; Men, 2008).

5.6.3. PCR em Tempo Real

O PCR em tempo real permite-nos fazer a caracterização de espécies através da análise de *melting* de alta resolução (HRM). A HRM é um novo método pós-PCR, homogéneo, em tubo fechado, que possibilita a análise genómica de variações genéticas [SNPs (polimorfismos de nucleótido único), mutações e metilações] nos amplicões do PCR. Esta técnica permite estudar a desnaturação do DNA de cadeia dupla com maior detalhe e maior rendimento (Hoffmann, 2007).

A HRM caracteriza as amostras de ácidos nucleicos com base no comportamento da sua dissociação. As amostras podem ser discriminadas de acordo com a sua sequência, conteúdo GC ou vertente complementar. Até mesmo variações numa única base como as SNPs podem ser detectadas (Hoffmann, 2007).

Uma aplicação de maior interesse da HRM é a digitalização de sequências genéticas para pesquisa da presença de variações desconhecidas em amplicões de PCR tornando-se uma alternativa para a sequenciação (Hoffmann, 2007).

As mutações nos produtos de PCR são detectáveis por HRM através da mudança de forma das curvas de *melt* de DNA. Estas curvas podem ser detectáveis através de uma combinação de corantes de DNA de nova geração, instrumentos específicos e um *software* de análise de dados (Hoffmann, 2007).

No que diz respeito à genotipagem e sequenciação de mutações, a análise de *melting* de alta resolução do DNA surge como a técnica de eleição pois é uma técnica simples, barata, precisa e rápida (Hoffmann, 2007).

Os instrumentos específicos para realização de HRM, tem de ser capazes de capturar os sinais fluorescentes com melhor precisão óptica e térmica. Estes instrumentos necessitam de possuir uma iluminação de alta intensidade, capacidade óptica de alta sensibilidade, aquisição de alta velocidade, habilidade de controlar a temperatura das

amostras de forma que a que a variação térmica entre as amostras seja quase nula (Hoffmann, 2007).

Além da instrumentação específica requerida a HRM utiliza corantes especiais de saturação que apenas emitem fluorescência na presença de DNA de dupla hélice. Estes corantes são incluídos no processo de amplificação do PCR. Quando as amostras são sujeitas a elevadas temperaturas, ocorre a desnaturação do DNA de dupla hélice e a fluorescência desaparece originando assim a curva de *melting*. As diferentes sequências separam-se a temperaturas ligeiramente diferentes. Esta separação a diferentes temperaturas pode ser observada e detectada através desta curva de *melting*. Uma única mudança de base origina diferenças na curva de *melting* (Hoffmann, 2007).

Após a amplificação das amostras de DNA por PCR em tempo real onde foi usado um corante de DNA com propriedades de saturação é então obtida a curva de *melting*. Esta curva é obtida a partir dos elevados dados da taxa de aquisição de fluorescência e posteriormente processados num *software* específico que vai depois realizar três etapas fundamentais nesta análise (Hoffmann, 2007):

1. Normalização: em que os sinais pré-*melting* (fluorescência inicial) e pós-*melting* (fluorescência final) de todas as amostras são definidos como uniformes, valores relativos de 100% a 0%.
2. Mudança de temperatura: em que o eixo da temperatura de *melting* normalizado é deslocado para o ponto onde o DNA de cadeia dupla é completamente desnaturado.
3. Diferença de sinopse: em que são analisadas as diferenças na forma da curva de fusão pela subtração das curvas a partir de uma curva de referência facilitando o agrupamento das amostras em grupos de *melting* semelhantes (por exemplo, aqueles que são heterozigóticos e homozigóticos).

Esta nova técnica de HRM tem revelado ser um método bem estabelecido para a caracterização de amplicões [identificação microbiana ou para detecção de mutações e polimorfismos de nucleótido único (SNP)] (Hoffmann, 2007).

6. Optimização do PCR

Existem vários parâmetros que podem influenciar uma reacção de PCR em tempo real. Para optimizar a reacção, temos de ter sempre em conta os parâmetros que influenciam o rendimento, a reprodutibilidade, a especificidade e sensibilidade da reacção.

6.1. Desenho dos *primers* e sondas

Para obtenção de bons resultados nesta reacção, isto é, para que a reacção seja específica e sensível, é necessário que os *primers* e a sonda sejam bem desenhados.

Primeiro deve seleccionar-se a sonda e só depois deve desenhar-se os *primers*, o mais próximo possível, para que os produtos do PCR não sejam grandes de mais (entre 100 e 250 pb). A temperatura de *melting* das sondas deve ser cerca de 8 a 10°C, mais elevada que a dos *primers*. Não se deve terminar a extremidade 5' com uma guanina (G) pois pode dar origem ao efeito *quenching* (Innis MA, 1990).

No desenho dos *primers* deve ter-se especial atenção às últimas três bases para evitar que haja amplificação de produtos inespecíficos. Para tal a extremidade 3' não deve ter mais de duas citosinas (C) ou guaninas (G).

Quanto à concentração ideal de *primers* numa reacção deve andar entre os 0,1 e 0,5 µM. Elevadas concentrações de *primers* diminuem o rendimento da reacção favorecendo a formação de *primer-dimer* (Innis MA, 1990).

A temperatura de *melting* para os dois *primers* deve ser semelhante e deve andar entre os 55 e os 80°C contudo, varia conforme a composição dos *primers*. Esta temperatura é calculada através da fórmula termodinâmica que provém da estabilidade que se adquire

ou não com os oligonucleótidos. Hoje em dia, esta fórmula é calculada por um *software* de desenho de *primers* (Wittwer K, 2004).

6.2. Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTPs).

A concentração de dNTPs a que se obtém um maior rendimento e especificidade deve andar entre os 20 e 200 μM . Os quatro nucleótidos devem conter a mesma concentração para que não hajam erros de incorporação. As elevadas concentrações de dNTPs normalmente aumentam este tipo de erros. Já concentrações demasiado baixas diminuem o rendimento da reacção (Innis MA, 1990).

6.3. Taq polimerase

A concentração de enzima ideal para protocolos otimizados deve andar ente 1 e 2,5 U/100 μL de reacção. Quando se está a otimizar um protocolo aconselha-se que se teste a enzima entre 0,5 e 5 U/100 μL de reacção e se verifique os resultados num gel de electroforese.

Elevadas concentrações da enzima podem originar fragmentos não específicos já as baixas concentrações diminuem o rendimento da reacção (Innis MA, 1990).

6.4. Tampão

O tampão aconselhado para PCR deve conter entre 10 a 50 mM de *Tris-HCl*; KCl tendo em atenção que concentrações superiores a 50 mM podem inibir a actividade da Taq polimerase; aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$ de BSA (*bovine serum albumine*) e entre 0,05 a 0,1% de detergentes não iónicos (*Tween 20*, por exemplo) que ajudam a estabilizar a Taq polimerase. Habitualmente as soluções tampão já costumam conter 1,5 mM de MgCl_2 visto ser o parâmetro mais importante para a especificidade e rendimento da reacção (Innis MA, 1990).

6.5. MgCl₂

A concentração de MgCl₂ pode afectar desde a hibridação dos *primers*, temperatura de dissociação das cadeias, a especificidade do produto, formação de *primer-dimer* e a actividade e fidelidade da Taq polimerase (Innis MA, 1990).

A concentração ideal de MgCl₂ é variável devendo iniciar-se com uma concentração de 1,5 mM (normalmente já incluída no tampão). Um excesso de concentração pode traduzir-se na acumulação de produtos inespecíficos enquanto que uma diminuição está muitas vezes associada a uma diminuição do rendimento da reacção.

A presença de agentes quelantes (ex. EDTA) nos *primers* e no DNA alvo pode causar oscilações na concentração óptima de magnésio (Innis MA, 1990). A concentração de dNTPs deve ser determinada em conjunto com a titulação de magnésio para que haja um rendimento óptimo da reacção (Persing DH, 1993).

6.6. Ciclos: número, tempo e temperaturas nas diferentes fases

O número, tempo e temperaturas das diferentes fases dependem do equipamento que se usa, dos *primers*, da composição dos fragmentos a amplificar e até dos tubos utilizados.

As condições típicas de desnaturação são de 94°C contudo, esta temperatura pode aumentar para produtos com elevada predominância de guaninas (G) e citosinas (C). Tempos longos e temperaturas elevadas de desnaturações podem afectar a actividade da Taq polimerase. Pelo contrário, tempos curtos e temperaturas baixas, dão origem a uma desnaturação insuficiente traduzindo-se num baixo rendimento de reacção (Roche, 2003).

A temperatura ideal de hibridação dos *primers* varia consoante a temperatura de *melting* dos *primers* e das sondas. Por norma, esta temperatura deve ser inferior cerca de 5°C da temperatura de *melting*. Esta temperatura tem grande impacto na especificidade da reacção. O seu aumento traduz-se numa maior especificidade da reacção contudo, pode

acarretar uma diminuição de rendimento e consequente reprodutividade (Witter C, 2004).

O tempo de extensão dos *primers* varia consoante o tamanho da sequência que se pretende amplificar. Por norma 15-30 segundos a uma temperatura de 72°C são suficientes para a extensão de produtos abaixo de 1000 pb nos equipamentos *fast-cycling*. Nos equipamentos mais lentos a extensão dos *primers* pode durar 1-2 minutos.

Considerando que todos os outros parâmetros se encontram otimizados, o número óptimo de ciclos varia em função da concentração inicial do DNA. Um excesso de ciclos pode levar a um aumento de produtos inespecíficos. Pelo contrário, uma diminuição pode levar a um decréscimo do rendimento da reacção. Nos equipamentos *fast-cycling*, em média 30-50 ciclos de amplificação requerem apenas entre 30 a 40 minutos (Witter C, 2004).

7. Objectivos

Este projecto pretende iniciar o estudo epidemiológico da infecção causada por *Rhinovirus* na região do grande Porto, estando este dividido em quatro fases. Numa primeira fase pretende-se proceder a optimização de um protocolo por PCR em tempo real capaz de detectar as três espécies de *Rhinovirus*. Na segunda fase pretende-se fazer a colheita e preservação de amostras a uma população saudável e de fácil acesso para detecção molecular do *Rhinovirus*. A população eleita para esta primeira fase do projecto foi a população estudante da Universidade Fernando Pessoa. A terceira fase pretende estudar alguns grupos com risco clínico mais elevado, indivíduos de idade igual ou superior a 60 anos, crianças e adultos asmáticos e indivíduos com fibrose cística. Na última fase, serão estudados doentes de um centro de saúde do grande Porto com sintomatologia respiratória. Com o objectivo de se fazer uma caracterização molecular das estirpes encontradas, serão analisadas todas as amostras anteriormente colhidas tentando estabelecer assim, uma relação entre os subgrupos virais e os subgrupos populacionais bem como, com a maior ou menor frequência que os subtipos virais provocam sintomatologias mais exacerbada nos grupos de risco.

Espera-se através da detecção molecular do *Rhinovirus* obter associação entre sintomatologia, prevalência e incidência do vírus nas diferentes populações. Numa fase mais avançada deste projecto pretende-se também fazer a caracterização do vírus nas diferentes populações.

Nesta etapa inicial do projecto, pretende-se então fazer a optimização de um protocolo para fazer a detecção do *Rhinovirus* em PCR em tempo real para ser aplicada à população saudável e de fácil acesso. Esta etapa passa também pela adequada colheita e preservação das amostras na respectiva população, detecção do *Rhinovirus* na população e tratamento estatístico de todos os resultados obtidos. É também um objectivo importante nesta fase do projecto traçar estratégias de melhoramento dos procedimentos adoptados para as futuras etapas do projecto.

O presente projecto permitirá uma detecção rápida, sensível e específica do *Rhinovirus* contribuindo para esclarecer a epidemiologia da infecção no grande Porto. Pretende-se assim clarificar diversos parâmetros:

- Quais as subpopulações que se encontram mais predispostas a infecções por *Rhinovirus*;
- Que subtipos virais provocam uma exacerbação de sintomatologia nas diferentes subpopulações incluindo as populações de risco;
- Quais as épocas do ano em que as infecções por *Rhinovirus* são mais frequentes no Porto;
- Que subtipos virais prevalecem nas diferentes populações e nas diferentes épocas sazonais;

Tendo todos estes parâmetros impacto na taxa de absentismo escolar e laboral associada a esta infecção no Grande Porto.

Todos estes dados poderão em última análise contribuir para melhorar as medidas de prevenção da infecção por *Rhinovirus*, ajudando assim a reduzir a taxa de absentismo escolar e laboral associada a esta infecção.

Parte II

Optimização de uma Reacção de PCR-em-Tempo-Real para a detecção de *Rhinovirus*

1. Objectivo

No presente trabalho pretendeu-se otimizar uma reacção de Semi-nested-RT-PCR-em-Tempo-Real para a detecção de *Rhinovirus*.

Como estratégia geral adoptou-se como ponto de partida o protocolo de Semi-nested RT-PCR descrito em 2008 por Harvala *et al.*

Neste protocolo, uma primeira reacção de RT-PCR amplifica todas as espécies de *Rhinovirus* e *Enterovirus*, sendo a especificidade atribuída posteriormente pela reacção de Nested-PCR. Para tal são realizadas 3 reacções distintas: uma específica para *Rhinovirus* A e *Rhinovirus* B (não os diferenciando), uma segunda reacção apenas amplifica *Rhinovirus* C, e uma terceira reacção apenas amplifica *Enterovirus*.

2. Material e Métodos

2.1. Amostras

Os controlos positivos utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo *National Institute for Health and Welfare* da Finlândia que desenvolveu um estudo epidemiológico da infecção por *Rhinovirus* na Finlândia (Savolainen-Kopra, 2009).

Os controlos positivos recebidos consistiram em amostras liofilizadas de RNA extraído de uma cultura de *Rhinovirus* A tipo 2.

Os controlos positivos foram preparados dissolvendo a amostra primária liofilizada em 50 µl de água isenta de nucleases. A partir destes controlos concentrados foram preparadas diluições seriadas até se obterem amostras com concentrações de 10^{-3} a 10^{-8} da amostra original. Todos os controlos foram conservados a -70°C .

2.2. Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi executada a partir das zaragatoas nasais utilizando o MagMAX™ AI/ND Viral RNA Isolation Kit (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante. A extração decorreu na sala de culturas após descontaminação da sala e da câmara de Fluxo Laminar, por irradiação UV durante 30 minutos (irradiação da sala e da câmara de Fluxo com sistemas dedicados e independentes).

Após preparação dos reagentes do Kit de extração de acordo com as instruções do fabricante, procedeu-se à extração do RNA. Para tal, após a descongelação das amostras à temperatura ambiente, estas foram vortexadas vigorosamente durante 30 segundos. Com a ajuda de uma pinça inverteu-se a zaragatoa e após nova agitação no vortex durante 30 segundos, recolheu-se a suspensão da amostra por centrifugação, descartando a zaragatoa. Adicionou-se então à suspensão da amostra, 802 µL de *Viral Lysis/Bindind solution*, e após nova agitação no vortex (30 segundos) fez-se uma breve centrifugação para remover as gotas da parede e da tampa do *ependorf*. Adicionou-se então 20 µL da suspensão de *beads* (ressupensa em vortex imediatamente antes de ser

utilizada) e após agitação em vortex manteve-se os tubos com agitação moderada durante 4 minutos. Após uma breve centrifugação para recolher os restos da suspensão das paredes e tampa do *ependorf*, com a ajuda de um magneto capturou-se as *beads* durante 3 minutos e descartou-se a solução. Procedeu-se a sucessivas lavagens das *beads*. Primeiro uma vez com 400 µL de *Wash Solution 1*, e depois duas vezes com 200 µL de *Wash Solution 2*. Depois de um breve passo para secar ligeiramente as *beads* ao ar durante 2 minutos, e tendo verificado que os *ependorfs* ficaram sem vestígios de solução, a Eluição do RNA foi feita com 50 µL de *Elution Buffer* vortexando vigorosamente durante 3 minutos. Com a ajuda do magneto descartaram-se as *beads* magnéticas e recolheu-se o sobrenadante com o RNA para outros *ependorfs* devidamente identificados. Congelou-se o RNA a -70° até à sua utilização no RT-PCR.

2.3. Selecção dos *primers*

Foram utilizados os *primers* previamente descritos num estudo publicado em 2008 por Harvala et al (*Epidemiology and Clinical Associations of Human Parechovirus Respiratory Infections ref. n.º5*). A sequência dos *primers* encontra-se descrita na tabela V.

Tabela V - Sequências dos *primers* utilizados.

<i>Primer</i>	Sequência ^{a)}
OS	5'-HCAAGY ACTTCT GTYWCC CCS G-3'
OAS	5'-GAAACA CGGACA CCCAAA GTA GT-3'
ISRhvA_B	5'-CYAGCC TGCGTG GCKGCC WRC-3'
ISRHVC	5'-GTAGCC YGCGTG GTGCCC WGC-3'
ISHEV	5'-GGCTGC GYTGGC GGCCTRC-3'

a)Na descrição da sequência dos *primers* foi utilizada a nomenclatura da IUPAC (www.bioinformatics.org/sms/iupac.html). Resumidamente, para além dos códigos habituais dos nucleótidos, as posição degeneradas são: R=A/G; Y= C/T; S=G/C; W=A/T; Y=C/T; S=G/C; W=A/T; K=G/T; M=A/C; B=C/G/T; D=A/G/T; H=A/C/T; V=A/C/G; N=A/C/T/G

3. Optimização do Protocolo

A amplificação foi realizada no Termociclador-em-Tempo-Real *LightCycler* (Roche). Este equipamento, sendo o termociclador comercial mais rápido disponível neste momento, permite o desenvolvimento de um protocolo extremamente rápido, específico e sensível.

A optimização deste protocolo ocorreu em duas etapas: a primeira referente a um primeiro RT-PCR onde foram usados os *primers* OS e OAS para que fossem amplificados todos os *Enterovirus* presentes nas amostras. A segunda etapa consistiu na realização de um Semi-Nested-PCR usando-se os *primers* que conferiam especificidade da espécie. Para além do *primer* OAS foram também usados os *primers* ISRhA_B (conferem especificidade às espécies de *Rhinovirus* A e B) e ISHEV (conferem especificidade aos *Enterovirus*). Por não haver um controlo positivo da espécie de *Rhinovirus* C não se testou o protocolo com o *primer* ISRHVC (específico do *Rhinovirus* C).

Para preparar as misturas de reacção foram utilizadas soluções stock de cada *primer* (OS, OAS, ISRhA_B e ISHEV) a 5 µM.

Para o RT-PCR usou-se o *kit iScript SYbrGreen* RT-PCR da BioRad, que contém todos os reagentes (com excepção dos *primers* e da enzima) pré-misturados numa concentração dupla da concentração final desejada.

Foi testado inicialmente um programa térmico semelhante ao descrito em 2008 por Harvala para o PCR convencional (Harvala, 2008) consistindo numa reacção de transcriptase reversa e activação da Taq polimerase a 95°C durante 5 minutos. A amplificação decorreu durante 40 ciclos com desnaturação a 95°C durante 18 segundos, hibridação dos *primers* a 50°C durante 21 segundos e polimerização a 72°C durante 90 segundos. A aquisição de fluorescência decorreu no final da fase de amplificação.

A composição das misturas de reacção iniciais incluiu o Tampão do *kit* à concentração indicada pelo fabricante e concentrações equimolares dos 2 *primers* (OS e OAS) de 0,5 μ M. No protocolo com os reagentes da BioRad todos os restantes reagentes foram fornecidos pelo tampão fornecido com o *kit*.

Esta mistura de reacção foi então submetida às variações térmicas programadas, supracitadas, em capilares de 20 μ l do *LightCycler* (Roche) adicionando-se inicialmente 1 μ l de RNA ou *non-template-control* (NTC) a cada capilar.

Foram testadas diferentes concentrações de *primers*, diferentes tempos de desnaturação, hibridação e extensão, diferentes temperaturas de hibridação e rampas térmicas diferentes (tabela VI).

Tabela VI - Lista das condições testadas para a optimização do protocolo de amplificação do PCR 1 com o kit da BioRad.

Variações de Concentração		Variações de Tempo nas fases do PCR			Variações de Temperatura			Rampa de extensão	Ciclos
<i>Primer</i> OS (μ M)	<i>Primer</i> OAS (μ M)	Desnaturaçã (seg)	Hibridação (seg)	Extensão (seg)	desnat. ($^{\circ}$ C)	Hibridação ($^{\circ}$ C)	Extensão ($^{\circ}$ C)		
0,05	0,05	0	5	10	94	50	72	5	40
0,1	0,1	1	10	15		54		10	50
0,25	0,25	5	15	20				20	
0,5	0,25	18	21	30				80	
				40				85	
				60					
				90					

No Semi-Nested-PCR a amplificação inicial decorreu durante 40 ciclos com desnaturação a 94 $^{\circ}$ C durante 0 segundos, hibridação dos *primers* a 50 $^{\circ}$ C durante 10 segundos e polimerização a 72 $^{\circ}$ C durante 30 segundos. A aquisição de fluorescência decorreu no final da fase de amplificação. A composição das misturas de reacção iniciais incluiu o Tampão do *kit* na concentração indicada pelo fabricante e concentrações equimolares dos *primers* (OAS e IS RhvA_B; OAS e ISHEV) de 0,25 μ M. Os restantes reagentes foram fornecidos pelo tampão fornecido com o *kit* da BioRad.

Esta mistura de reacção foi então submetida às variações térmicas programadas, supracitadas, em capilares de 20 µl do *LightCycler* (Roche) adicionando-se inicialmente 1µl de RNA ou *non-template-control* (NTC) a cada capilar. Foram igualmente testadas diferentes concentrações de *primers*, diferentes tempos de desnaturação, hibridação e extensão, diferentes temperaturas de hibridação e variações de ramping diferentes listadas na tabela VII.

Tabela VII - Lista das condições testadas para a optimização do protocolo de amplificação do PCR 2.

<i>Primer</i> OAS (µM)	Variações de Concentração		Variações de Tempo nas fases do PCR			Variações de Temperatura			Rampa	Ciclos
	<i>Primer</i> IS RhvA_B (µM)	<i>Primer</i> ISHEV (µM)	Desnaturação (seg)	Hibridação (seg)	Extensão (seg)	Desnaturação (°C)	Hibridação (°C)	Extensão (°C)		
0,25	0,25	0,25	0	5	30	94	50	72	5	40
0,5	0,5	0,5	5	10	40		54		10	
			10	15			56		20	
							58		80	
							60		85	

4. Resultados

Com o objectivo de se criar um protocolo específico e o mais sensível possível para a detecção das 3 espécies do *Rhinovirus* optou-se por otimizar um Semi-Nested-PCR em que, numa primeira fase se optimizou um RT-PCR com *primers* específicos para todos os *Enterovirus* (*primers* OS e OAS) e posteriormente o Semi-Nested-PCR que atribuía a especificidade das diferentes espécies através de 3 *primers* distintos, um que conferia a especificidade aos *Enterovirus* (IS HEV); outro que conferia especificidade às espécies A e B de *Rhinovirus* (IS RhvA_B) e um outro que conferia especificidade às espécies de *Rhinovirus* C (IS RhvC). Destes três *primers* apenas se testou os *primers* IS RhvA_B e o IS HEV e apenas se obteve reprodutividade para os ensaios com o *Primer* IS RhvA_B.

Para o RT-PCR foram realizados 36 ensaios tendo sido testadas diferentes variáveis. Testaram-se diferentes concentrações de *primers*, diferentes tempos de desnaturação, hibridação e extensão; diferentes temperaturas de hibridação; rampas distintas, diferentes temperaturas de aquisição de fluorescência e diferentes volumes de amostra (ver tabela VIII).

No primeiro ensaio do RT-PCR foi testada uma mistura de reacção inicial com o tampão fornecido pelo *kit* (Biorad) que incluía todos os reagentes necessários para a reacção ocorrer numa concentração indicada pelo fabricante e concentrações equimolares dos 2 *primers* (OS e OAS) de 0,5 μM . O programa térmico testado foi semelhante ao publicado em 2008 por Harvala *et al* para o PCR convencional (Harvala, 2008). A aquisição de fluorescência decorreu no final da fase de amplificação. Foram testadas quatro amostras: um controlo negativo (NTC) e três controlos positivos com concentrações distintas 10^{-5} ; 10^{-4} e 10^{-3} . Todas as amostras deste ensaio resultam em ensaios positivos incluindo o NTC como se pode verificar na figura 13. Após análise dos picos de temperatura de *melting* pode verificar-se que todas as amostras (incluindo NTC) revelaram a presença de picos de temperatura de *melting* inespecíficos, porém os três controlos positivos apresentaram também um pico específico como se pode observar na figura 14.

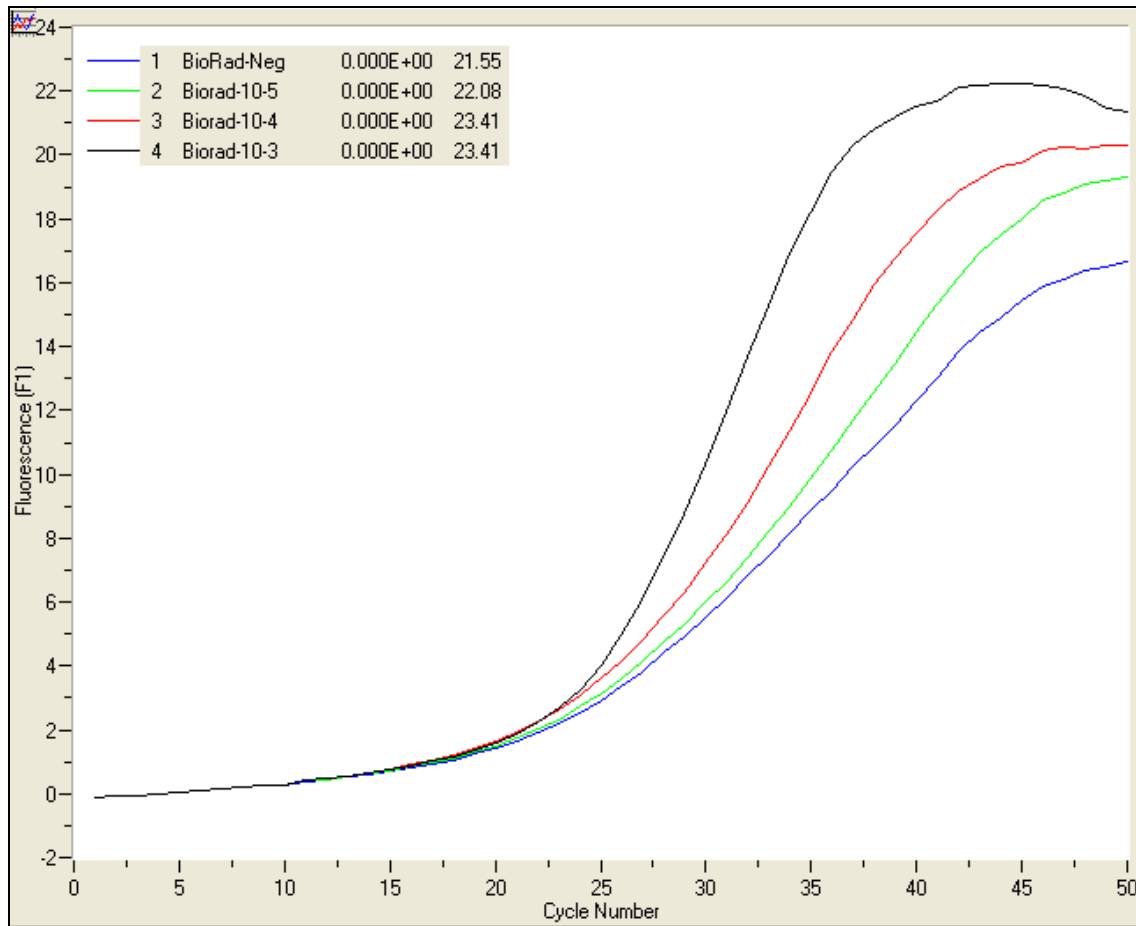


Fig. 13 Curva de amplificação do ensaio inicial.

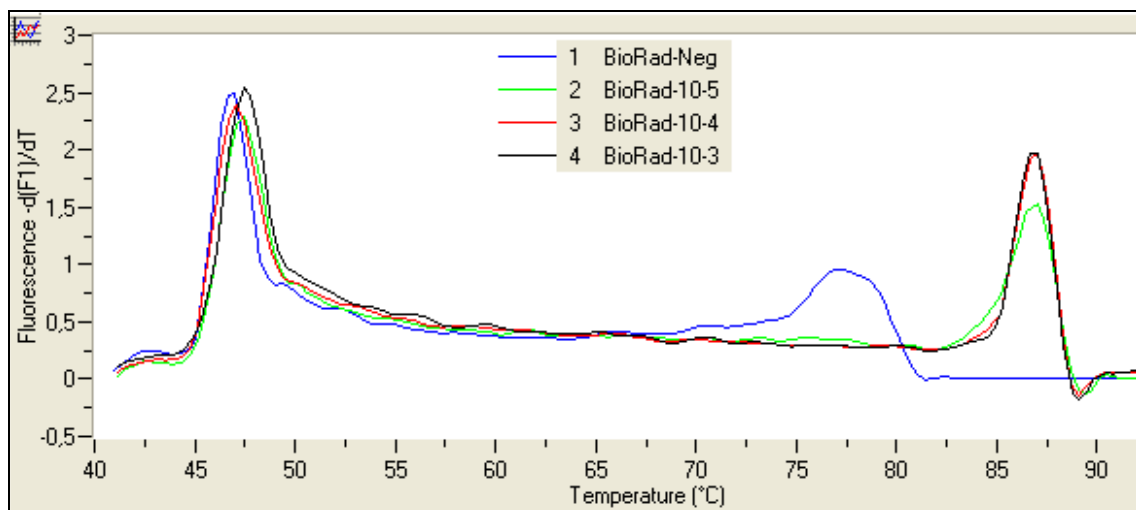


Fig. 14 Análise das temperaturas de *melting* do ensaio inicial.

Até se chegar ao ensaio otimizado foram testadas as variáveis anteriormente referidas que se encontram listadas na tabela VIII. Nesta tabela indicam-se os resultados obtidos correspondentes à melhor sensibilidade registada para cada variável. Foram testadas

diluições seriadas (10^{-3} a 10^{-8}) do sobrenadante de uma cultura viral de *Rhinovirus*. Nunca foi obtido sinal positivo para a diluição 10^{-8} (tabela VIII).

Tabela VIII - Registo das diferentes variáveis testadas no RT-PCR e da melhor sensibilidade obtida para cada uma delas.

Parâmetro	Valor	Melhor sensibilidade obtida
Concentração de <i>Primers</i> (OS e OAS)	0.05 / 0.05 μM	Nunca amplificou
	0.10 / 0.10 μM	Nunca amplificou
	0.25 / 0.25 μM	10^{-7}
	0.50 / 0.10 μM	10^{-3}
	0.50 / 0.50 μM	10^{-5}
	0.50 / 0.25 μM	10^{-7}
Rampa para a extensão	20°C/s	10^{-7}
	10°C/s	10^{-4}
	5°C/s	10^{-7}
Duração da extensão	90 s	10^{-7}
	60 s	10^{-5}
	40 s	10^{-7}
	30 s	10^{-4}
	20 s	10^{-4}
	15 s	10^{-5}
	10 s	Nunca amplificou
Duração da hibridação	40 s	10^{-7}
	21 s	10^{-7}
	15 s	10^{-4}
	10 s	10^{-5}
	5 s	10^{-5}
Temperatura de hibridação	54 °C	10^{-3}
	50 °C	10^{-7}
Duração da desnaturação	0 s	10^{-5}
	5 s	10^{-7}
	10 s	10^{-3}
	18 s	10^{-7}
Volume de Amostra	1 μL	10^{-7}
	4/5 μL	10^{-7}

Testaram-se os *primers* em concentrações equimolares e concentrações diferentes. Para concentrações de *primers* equimolares a maior sensibilidade foi obtida para concentrações de 0,25 μM (ver tabela VIII). Para concentrações de *primers* distintas a maior sensibilidade obteve-se com o *primer* OS numa concentração de 0,50 μM e o *primer* OAS numa concentração de 0,25 μM . Verificou-se que concentrações de *primers* inferiores a 0,2 μM são insuficientes (tabela VIII).

Foram também testadas diferentes rampas de extensão: 20, 10 e 5°C/s verificando-se que os ensaios onde se obteve maior sensibilidade foram os que foram realizados com rampas de 20 e 5°C/s (tabela VIII).

Ao testar-se diferentes tempos de extensão, verificou-se que tempos de extensão muito reduzidos (10 segundos) não são suficientes para a detecção. Os ensaios onde se obteve maior sensibilidade foram os que apresentavam tempos de extensão de 90 e 40 segundos sendo que, tempos de extensão de 40 segundos apresentam uma maior sensibilidade com uma rampa de 5°C/s para concentrações equimolares de 0,25°C/s. Tempos de extensão de 90 segundos apresentam uma melhor sensibilidade para concentrações de *primers* diferentes (OS = 0,50 µM e OAS = 0,25µM) com uma rampa de 20°C/s (tabela VIII).

Quanto ao tempo de hibridação os ensaios que apresentaram maior sensibilidade foram igualmente os tempos mais elevados, isto é, de 21 e 40 segundos. Tempos de hibridação de 21 segundos apresentam uma maior sensibilidade para concentrações de *primers* diferentes (OS = 0,50 µM e OAS = 0,25µM) e tempos de hibridação de 40 segundos para concentrações de *primers* equimolares (0,25 µM) (ver tabela VIII).

Testou-se também temperaturas de hibridação de 54°C porém assistiu-se a uma perda de sensibilidade sendo o ensaio mais sensível realizado a 50°C (ver tabela VIII).

Relativamente ao tempo de desnaturação, obteve-se maior sensibilidade para os ensaios com tempos de 5 segundos para concentrações de *primers* equimolares (0,25µM) e 18 segundos para concentrações de *primers* diferentes (OS = 0,50 µM e OAS = 0,25µM) (ver tabela VIII).

O volume da amostra parece não influenciar muito na sensibilidade dos ensaios porém, optou-se por volumes de 4 µL nas reacções de 10 µL e volumes de 5 µL nas reacções de maior volume para garantir uma melhor reprodutividade dos ensaios.

Com o objectivo de se obter apenas o máximo de sinal fluorescente específico optou-se por fazer a aquisição de fluorescência a 85°C eliminando assim a maioria do sinal inespecífico observado a temperaturas inferiores, o qual é devido às espécies de ácidos nucleicos inespecificamente amplificadas e que apresentam Tm inferior a 85°C (fig.14).

Na optimização do Semi-Nested-PCR foram realizados 25 ensaios utilizando o *primer* IS RhvA_B o qual confere especificidade para as espécies A e B de *Rhinovirus*.

No ensaio a partir do qual partiu a optimização do PCR semi-Nested foi testada uma mistura inicial com o tampão fornecido pelo kit em concentrações indicadas pelo fabricante (2X). Foram testadas concentrações equimolares de *primers* OAS e IS RhvA_B de 0,25 μ M. O programa térmico testado ocorreu com uma amplificação durante 40 ciclos com desnaturação a 94°C durante 0 segundos, hibridação dos *primers* a 50°C durante 10 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. A aquisição de fluorescência decorreu no final da fase de amplificação. À semelhança do que ocorreu na optimização do RT-PCR foram também aqui testadas várias variáveis que se encontram listadas na tabela X.

Tabela IX: Registo das diferentes variáveis testadas no RT-PCR e da melhor sensibilidade obtida para cada uma delas.

Parâmetro	Valor	Melhor sensibilidade obtida
Concentração de <i>Primers</i> (IS RhvA_B e OAS)	0,25 – 0,25 μ M	10⁻⁷
	0,25 – 0,50 μ M	10⁻⁷
	0,50 – 0,50 μ M	10 ⁻⁴
Rampa para a extensão	5°C/s	10 ⁻⁵
	10°C/s	10 ⁻⁵
	20°C/s	10⁻⁷
Duração da extensão	20 s	10 ⁻⁵
	30 s	10⁻⁷
	40 s	10 ⁻⁵
Duração de hibridação	5 s	10 ⁻⁵
	10 s	10⁻⁷
	15 s	10⁻⁷
Temperatura de hibridação	50 °C	10⁻⁷
	54 °C	10 ⁻⁵
	56 °C	10 ⁻³
	58°C	10 ⁻³
	60 °C	10⁻⁷
Duração da desnaturação	0 s	10⁻⁷
	5 s	10 ⁻³
	10 s	10⁻⁷
Volume de Amostra	1.0 μ L	10⁻⁷
	2.5 μ L	10⁻⁷
	5.0 μ L	10 ⁻⁶

Foram testadas concentrações de *primers* equimolares de 0,25 e de 0,50 μ M tendo-se verificado haver uma melhor sensibilidade da reacção para as concentrações de *primers*

equimolares mais reduzidas (0,25 μM) (ver tabela X). Testaram-se também concentrações de *primers* diferentes: 0,25 μM do *primer* IS RhvA_B e 0,50 μM do *primer* OAS que se mostraram bastante satisfatórios obtendo-se a maior sensibilidade com detecção do vírus até concentrações na ordem dos 10^{-7} .

Quanto à rampa de extensão foram testadas rampas de 5, 10 e 20 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ tendo-se verificado que a reacção tem a sua melhor sensibilidade com uma rampa de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ para concentrações de *primers* equimolares de 0,25 μM (ver tabela X).

A duração da extensão que obteve uma melhor sensibilidade foi de 30 segundos, apesar de ser precipitado assumir que com 40 segundos não se atingiria o máximo de sensibilidade uma vez que não foram testados produtos de PCR numa concentração de 10^{-7} .

A hibridação foi testada durante 5, 10 e 15 segundos verificando-se uma maior sensibilidade com tempos de 10 e 15 segundos (ver tabela X). Das diferentes temperaturas de hibridação testadas verificou-se que a maior sensibilidade foi obtida a 50 e 60 $^{\circ}\text{C}$ (ver tabela X). Optou-se por seleccionar um tempo de hibridação de 15 segundos a 60 $^{\circ}\text{C}$ para maximizar a especificidade dos *primers*.

A duração do tempo de desnaturação parece não influenciar muito a sensibilidade da reacção. A possível utilização de capilares de plástico faz com que seja mais prudente a utilização de um tempo de 10 segundos, maximizando a reprodutibilidade do ensaio com este tipo de capilares.

O volume da amostra parece igualmente não influenciar a sensibilidade da reacção. Assim, face aos volumes testados optou-se por usar um volume intermédio de 2,5 μL numa reacção de 10 μL com a finalidade de minimizar erros de pipetagens que poderiam ocorrer com volumes muito reduzidos e ao mesmo tempo manter a influência inibidora dos produtos da reacção de RT-PCR a um mínimo.

5. Discussão

5.1. Optimização do RT-PCR

Na optimização do RT-PCR-em-Tempo-Real o protocolo inicial, revelou ser específico e sensível, mas muito demorado. Assim, com o objectivo de encurtar a duração deste protocolo foram testadas várias condições de reacção com as várias diluições seriadas do controlo positivo (10^{-3} a 10^{-8}).

Depois de feita a análise das várias variáveis testadas e de as relacionar verifica-se a existência de dois ensaios capazes de assegurar uma boa sensibilidade para a detecção do *Rhinovirus* assegurando ambos a detecção viral até concentrações da ordem dos 10^{-7} (tabela IX).

Tabela X – Condições seleccionadas para os dois ensaios que obtiveram maior sensibilidade.

Ensaio	[OS]	[OAS]	Tempo de desnaturação	Hibridação		Extensão		Aquisição de fluorescência	Sensibilidade
				Tempo	Temperatura	Rampa	Tempo		
A	0,5 μ M	0,25 μ M	18s	21s	50°C	20°C/s	90s	85°C	10^{-7}
B	0,25 μ M	0,25 μ M	5s	40s	50°C	5°C/s	40s	85°C	10^{-7}

O ensaio A foi realizado com uma concentração de *primers* distintas: OS de 0,5 μ M e OAS 0,25 μ M com desnaturação a 95°C durante 18 segundos, hibridação dos *primers* a 50°C durante 21 segundos e extensão a 72°C durante 90 segundos. A rampa testada neste ensaio foi de 20°C/s com uma aquisição de fluorescência na fase final de amplificação a 85°C (tabela IX).

O ensaio B foi realizado com concentrações dos *primers* OS e OAS equimolares de 0,25 μ M, a desnaturação ocorreu a 95°C durante 5 segundos, hibridação dos *primers* a 50°C durante 40 segundos e a extensão a 72°C durante 40 segundos. A rampa utilizada

neste ensaio foi de 5°C/s e a aquisição de fluorescência decorreu no final da fase de amplificação a 85°C (tabela IX). Obteve-se então uma amplificação na ordem dos 10⁻⁷ (figura 15) com especificidade (figura 16).

Embora estes dois ensaios assegurem a mesma sensibilidade na detecção do *Rhinovirus* optou-se por seleccionar como ensaio ideal este último visto ser significativamente mais rápido.

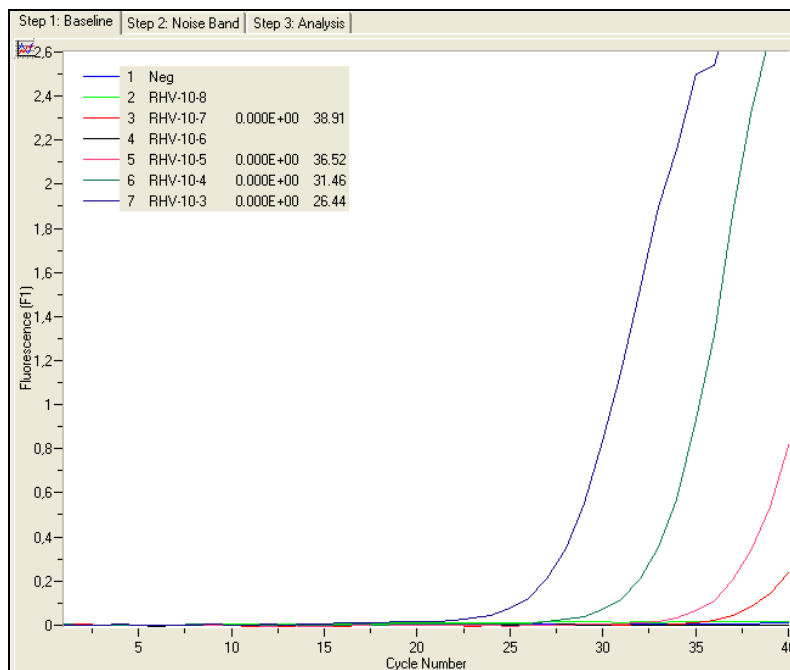


Fig 15 Amplificação do ensaio otimizado e considerado ideal do RT-PCR (ensaio B, ver tabela IX).

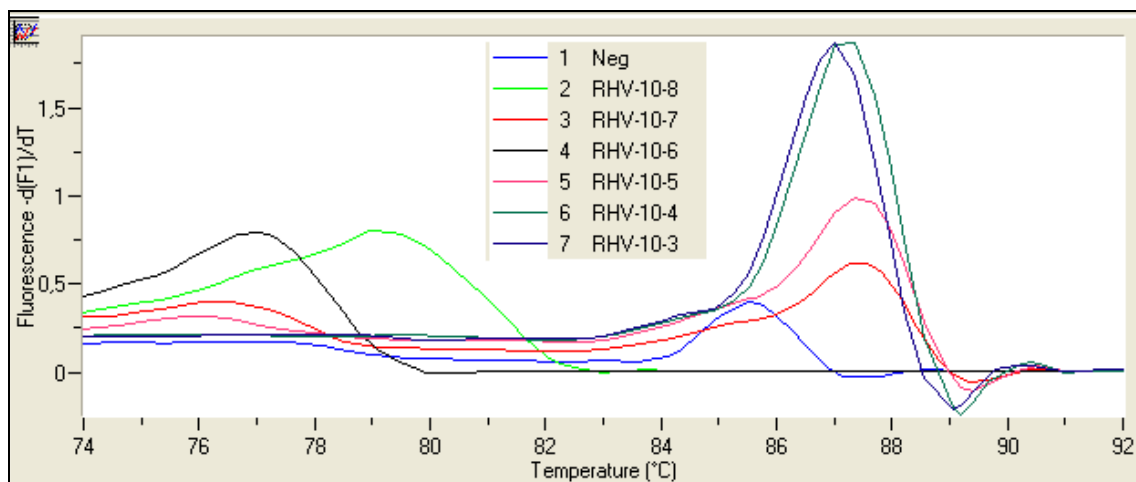


Fig 16 Análise das temperaturas de hibridação do ensaio otimizado e considerado como ideal (ensaio B, ver tabela IX).

5.2. Otimização do Semi-Nested-PCR

À semelhança do que foi feito na optimização do RT-PCR no Semi-Nested-PCR também foram testadas múltiplas variáveis com a finalidade de se obter um protocolo específico e o mais sensível possível no menor tempo possível.

Considerou-se então o ensaio ideal, aquele que foi realizado com uma concentração de *primer* OAS de 0,5 μ M e de *primer* IS RhvA_B de 0,25 μ M. A desnaturação ocorreu a 94°C durante 10 segundos, a hibridação ocorreu a 60°C durante 15 segundos e a extensão a 72°C durante 30 segundos. Usou-se uma rampa de 20°C/s e um volume de amostra de 2,5 μ L. Obteve-se assim a detecção mais sensível (10^{-7}) e específica como se pode observar nas imagens 17 e 18.

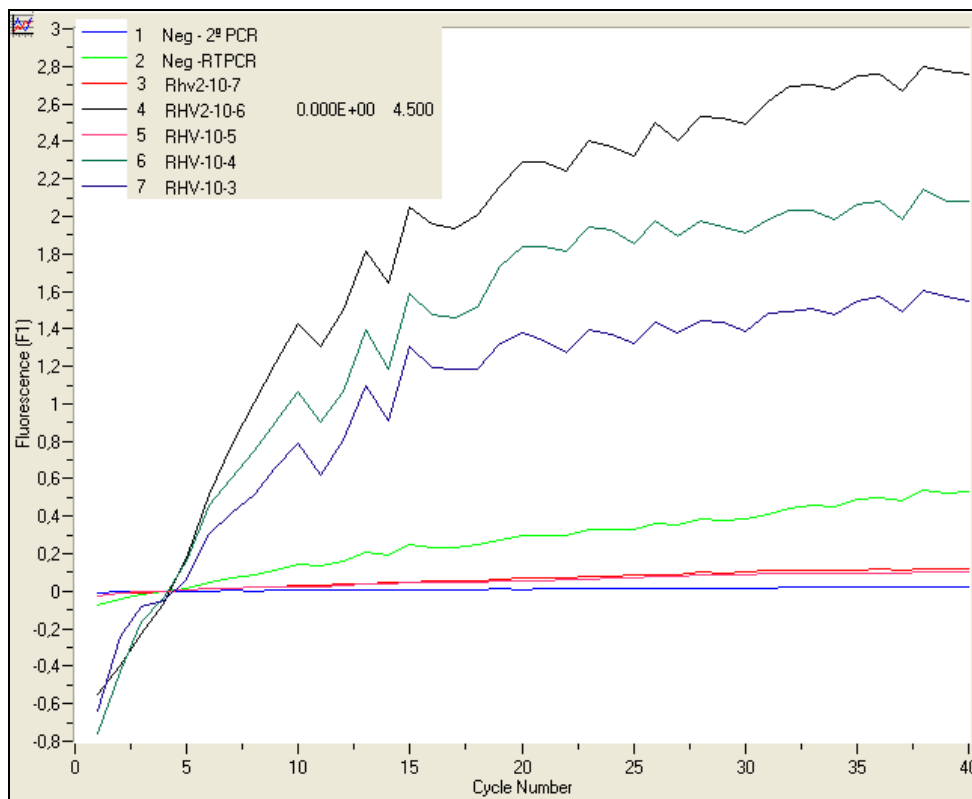


Fig 17 Amplificação do ensaio otimizado do Semi-Nested-PCR.

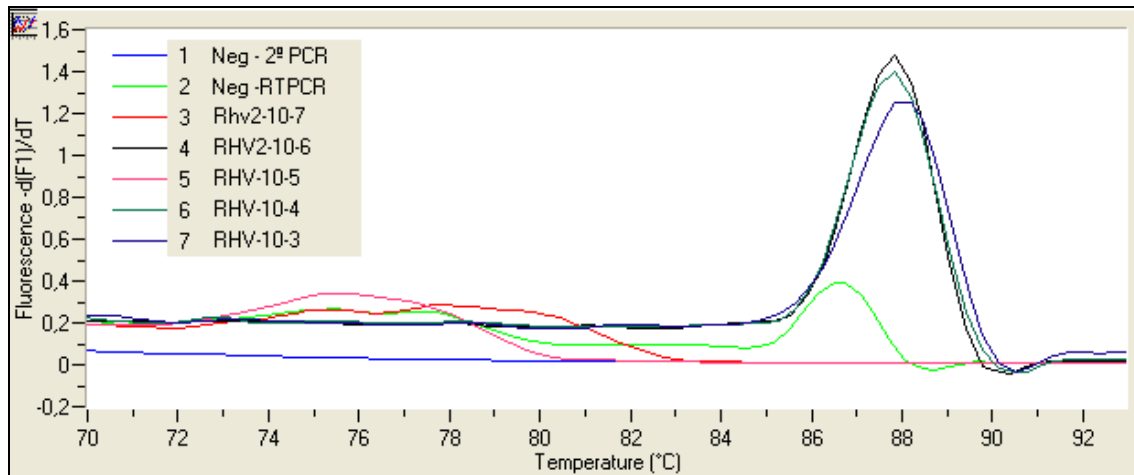


Fig 18 Análise das temperaturas de hibridação do ensaio otimizado para o Semi-Nested-PCR.

No decorrer da optimização do Semi-Nested-PCR com o *primer* IS RhvA_B, específico para as espécies de *Rhinovirus* A e B, foram também realizados 10 ensaios na tentativa de, numa mesma reacção obtermos especificidade às espécies de *Enterovirus*. Nesses ensaios usou-se o *primer* IS Hev onde foram igualmente testadas, concentrações de *primers* diferentes, diferentes tempos de desnaturação e hibridação, temperaturas de hibridação diferentes e temperaturas de aquisição diferentes.

A amplificação com especificidade do *Enterovirus* mostrou-se inviável com a utilização deste *primer* uma vez que o *Rhinovirus* também apresentava amplificação com este *primer*, independentemente das alterações introduzidas ao protocolo.

5.3. Especificidade dos *Primers*

O objectivo inicial deste estudo consistia em criar um protocolo sensível e específico através da técnica Semi-Nested-RT-PCR-em-Tempo-Real capaz de detectar as diferentes espécies: *Rhinovirus* A e B; *Rhinovirus* C e *Enterovirus*.

Para isso, foram seleccionados *primers* capazes de, numa primeira reacção, RT-PCR-em-Tempo-Real, amplificar todas estas espécies. Os *primers* seleccionados para esta primeira reacção foram os *primers* OS e OAS (tabela X).

Quando se alinhou (BioEdit, versão 7.0.4.1) a sequência das espécies de *Rhinovirus* A, B, C e de *Enterovirus* com os *primers* OS e OAS verificou-se que estes *primers* eram de facto capazes de amplificar todas as espécies pretendidas sem qualquer distinção entre estas (figuras 19, 20, 21 e 22).

Para uma segunda reacção, o Semi-Nested-PCR-em-Tempo-Real seleccionaram-se os *primers* que atribuíam a especificidade das espécies.

O IS RhvA_B específico para as espécies de *Rhinovirus* A e B; IS Rhv_C, específico para a espécie de *Rhinovirus* C; e IS HEV, específico para as espécies de *Enterovirus*.

À semelhança do alinhamento anteriormente feito para o RT-PCR-em-Tempo-Real foi feito um em função dos *primers* que conferiam especificidade a esta segunda reacção com as sequências das espécies de *Rhinovirus* A, B, C e *Enterovirus*. Para todos os *primers* foi possível observar-se homologia com as respectivas sequências de *Rhinovirus* e *Enterovirus* (figuras 23, 24, 25 e 26). A optimização do Semi-Nested-PCR-em-Tempo-Real tal como a tínhamos idealizado mostrou-se inviável.

Uma das razões para essa inviabilidade residiu na falta de controlos positivos para *Rhinovirus* do tipo B e C. Limitando-se logo esta detecção às espécies A e B de *Rhinovirus* sem diferenciação entre estas.

Outro dos motivos que tornou inviável a optimização de um protocolo capaz de identificar especificamente os *Enterovirus* foi o facto do *primer* que conferia especificidade ao *Enterovirus* (IS HEV) não se apresentar apenas específico dos *Enterovirus*. Com efeito, este *primer* mantém uma homologia final significativa com as espécies de *Rhinovirus* B (Fig. 27) o que explica porque às baixas temperaturas a que teve que ser utilizado não permitisse a discriminação entre *Enterovirus* e *Rhinovirus*.

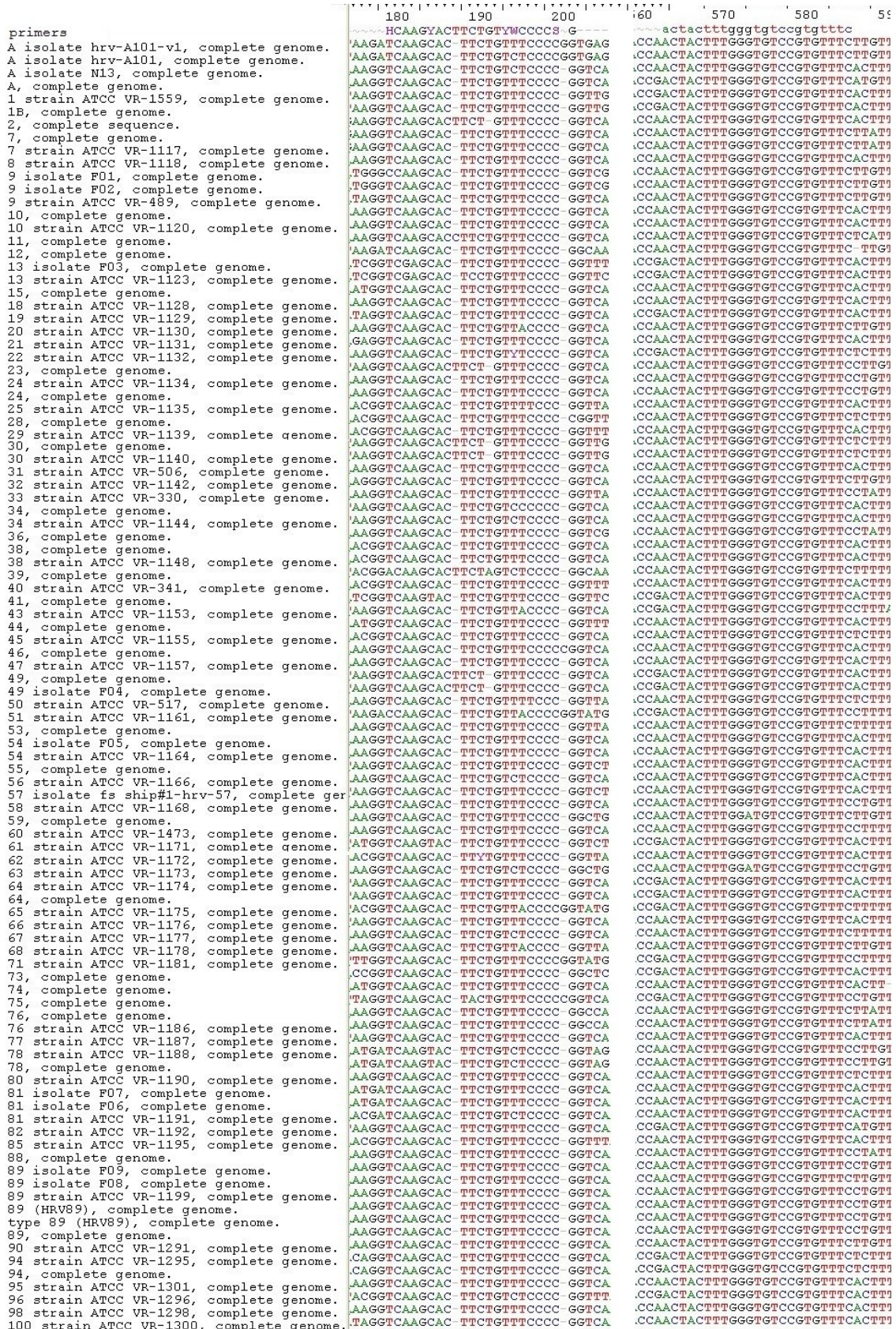


Fig. 19 – Alinhamento de todas as seqüências de *Rhinovirus* A disponíveis com os primers OS

e OAS.

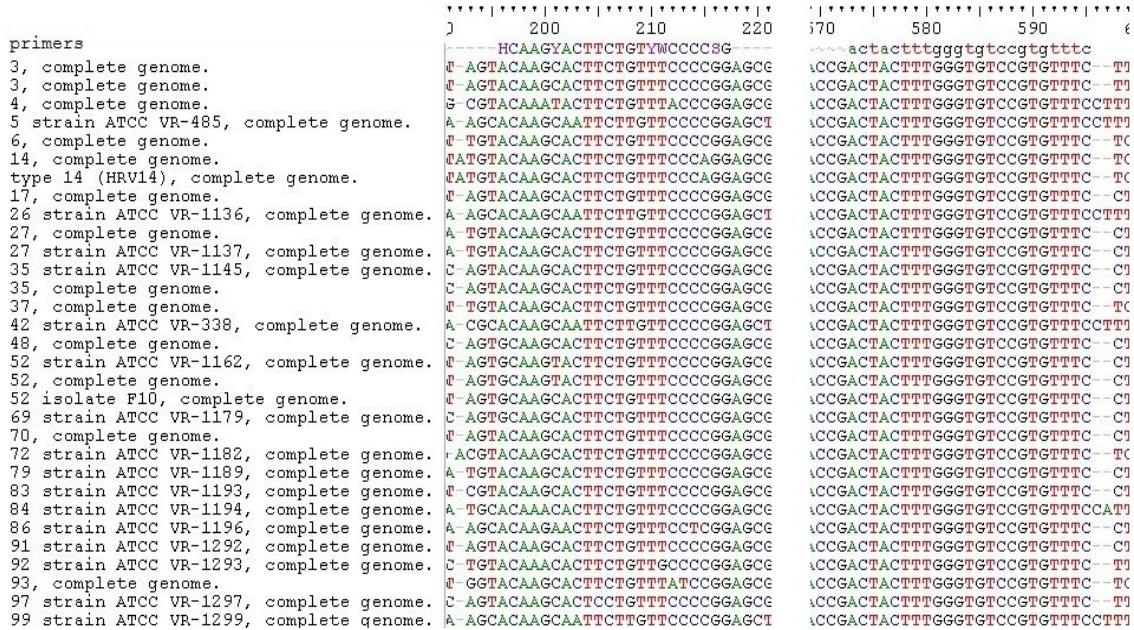


Fig. 20 – Alinhamento de todas as sequências de *Rhinovirus* B disponíveis com os primers OS e OAS.

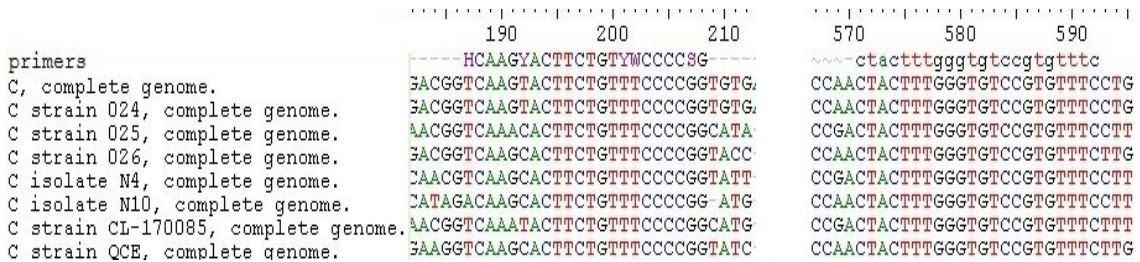


Fig. 21 – Alinhamento de todas as sequências de *Rhinovirus* C disponíveis com os primers OS e OAS.

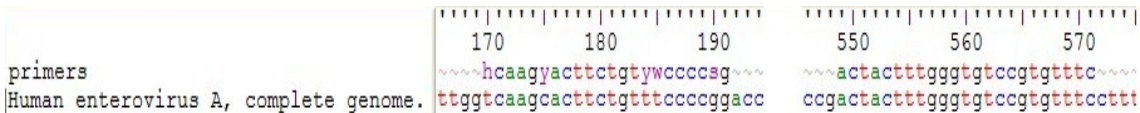


Fig. 22 – Alinhamento do genoma do *Enterovirus* A com os primers OS e OAS.

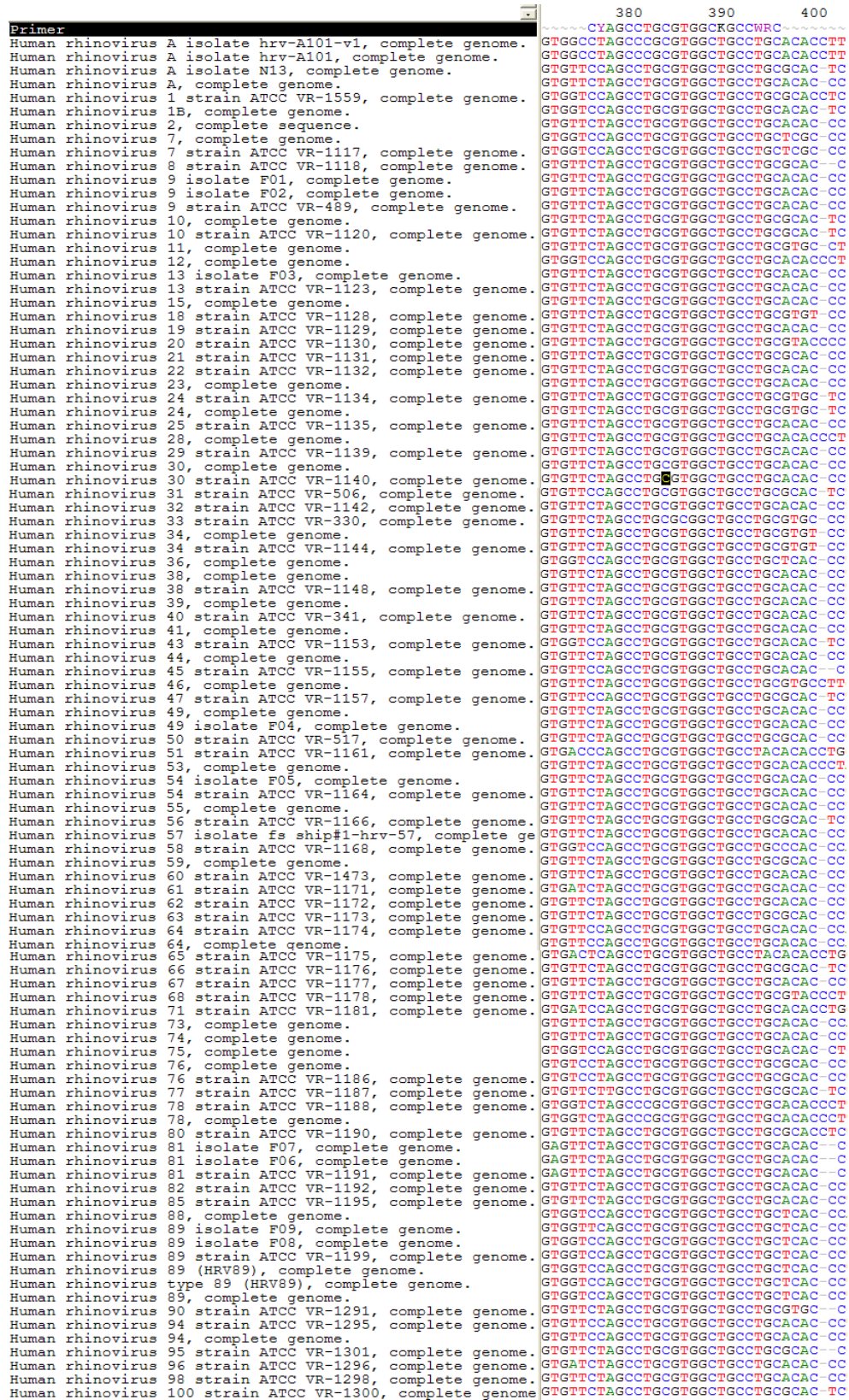


Fig. 23 – Alinhamento de todas as sequências de *Rhinovirus* A disponíveis com o primer IS RhvA_B.

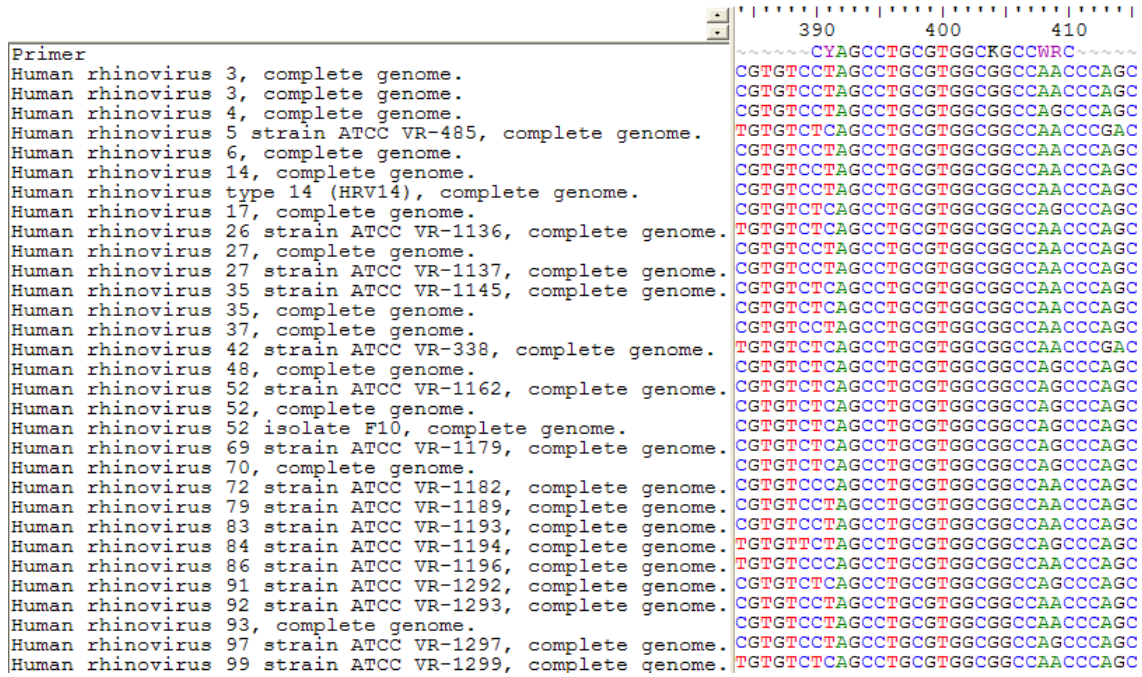


Fig. 24 – Alinhamento de todas as seqüências de *Rhinovirus* B disponíveis com o *primer* IS RhvA_B.

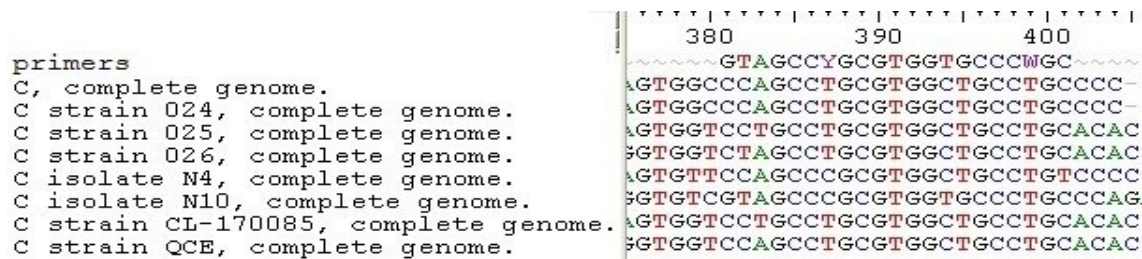


Fig. 25 – Alinhamento de todas as seqüências de *Rhinovirus* C disponíveis com o *primer* IS Rhv_C.

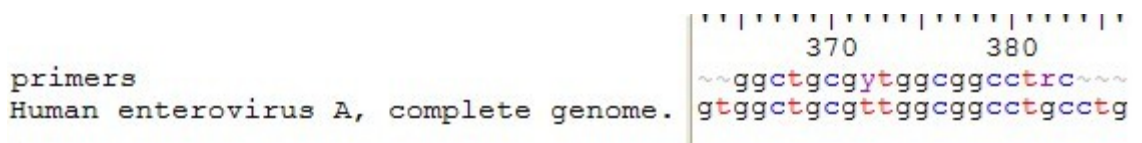


Fig. 26 – Alinhamento do genoma completo do *Enterovirus* A com o *primer* IS HEV.

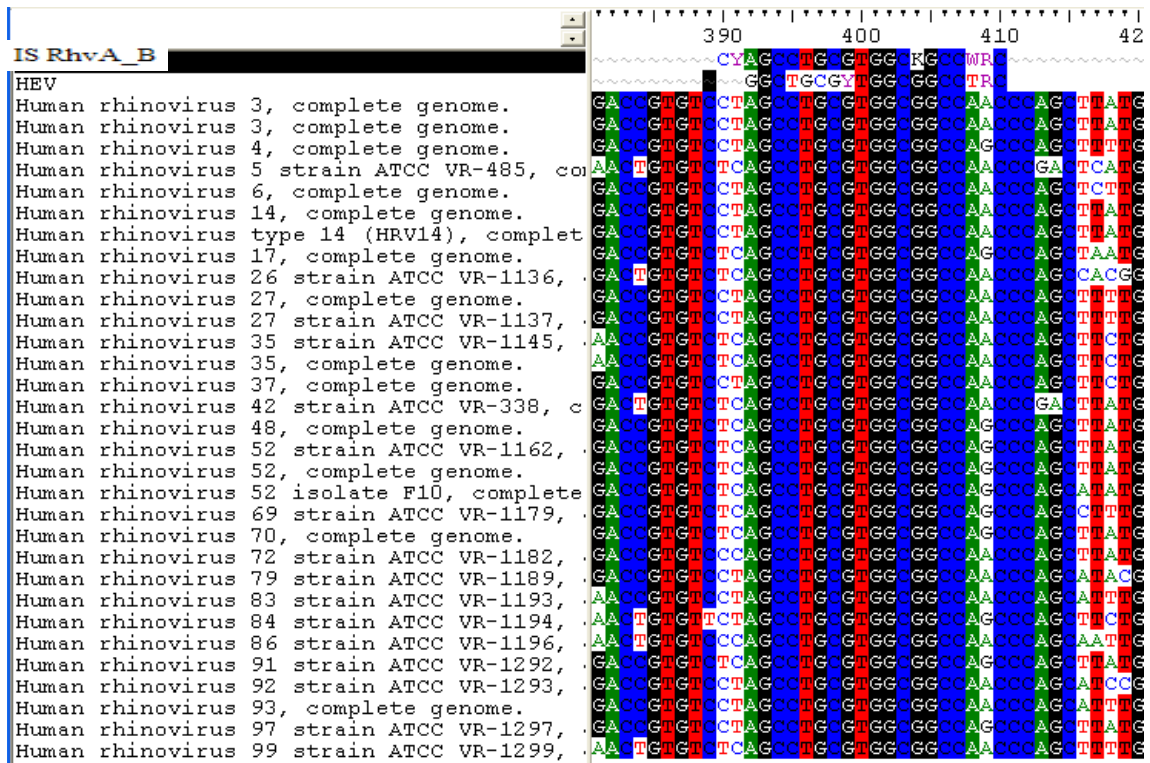


Fig. 27 – Alinhamento dos primeiros IS HEV (392-410pb) e IS RhvA_B (390-410pb) com a espécie de *Rhinovirus* B.

6. Conclusão

A optimização deste Semi-Nested-RT-PCR-em-Tempo-Real não ocorreu da forma como inicialmente se idealizou, isto é com a sensibilidade e especificidade para distinguir o *Rhinovirus* C e os *Enterovirus*. A ausência de um controlo positivo para o *Rhinovirus* C impossibilitou qualquer tentativa de inclusão deste no protocolo. Também a falta de especificidade do *primer* IS HEV, supostamente só específico para *Enterovirus*, tornou impossível a criação de um protocolo que distinguisse estas espécies.

A optimização foi então concluída com um protocolo que permite a detecção específica das espécies A e B de *Rhinovirus* (as mais frequentes), com uma sensibilidade suficiente para detectar uma diluição de 10 milhões de vezes da nossa amostra controlo.

Parte III

Estudo Epidemiológico da Infecção por *Rhinovirus* em Voluntários Jovens Saudáveis

1. Objectivo

No presente trabalho, utilizamos o método de Semi-Nested-RT-PCR-em-Tempo-Real por nós desenvolvido no capítulo anterior para:

- Avaliar a Sazonalidade individual da infecção por *Rhinovirus*;
- Avaliar se a infecção por *Rhinovirus* está associada à sintomatologia;
- Avaliar se a infecção por *Rhinovirus* está associada a dados climatológicos.

2. Material e Métodos

2.1. Amostras de Voluntários

As amostras foram obtidas na população estudante da Universidade Fernando Pessoa durante o período de um ano sendo a colheita realizada através de zaragatoa nasal uma vez por mês. Do universo de estudantes da Universidade que frequentam as disciplinas de Genética Molecular e Imunologia, 36 concordaram em ser voluntários no estudo. Dos 36 voluntários que assinaram o consentimento informado (anexo I), 10 abandonaram o estudo. Todos os 26 voluntários que prosseguiram até ao final, faltaram a pelo menos uma colheita durante o período do estudo.

A cada voluntário foi pedido para ler e assinar o documento de consentimento informado (anexo I) no início do estudo. Adicionalmente, em cada colheita foi solicitado que cada voluntário preenchesse um inquérito com a finalidade de avaliar a sintomatologia associada à infecção por *Rhinovirus* que cada voluntário apresentou nos 30 dias anteriores a cada colheita (anexo II).

Foram colhidas duas zaragatoas nasais, uma de cada narina uma vez que este método parece constituir o melhor compromisso entre a aderência dos voluntários e a sensibilidade analítica (Heikkinen, 2002).

Foram utilizadas zaragatoas estéreis de algodão. A zaragatoa foi gentilmente raspada no interior da narina a 2-3cm da entrada, após a colheita o cabo da zaragatoa foi partido, por forma a que o terminal de algodão destas fosse colocada num *ependorf* com 100 µL de RNAlater[®] (Ambion[®], Applied Biosystems) e conservado a -70°C até extracção do RNA viral.

Das 248 amostras colhidas, por razões orçamentais, apenas 138 amostras, representativas de 17 voluntários foram incluídas no presente estudo.

2.2. Controlos Positivos

Os controlos positivos utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo *National Institute for Health and Welfare* da Finlândia que desenvolveu um estudo epidemiológico da infecção por *Rhinovirus* na Finlândia (Savolainen-Kopra, 2009).

Os controlos positivos recebidos consistiram em amostras liofilizadas de RNA extraído de uma cultura de *Rhinovirus* A tipo 2. Estes foram preparados dissolvendo a amostra primária liofilizada em 50 µl de água isenta de nucleases. A partir destes controlos concentrados foram preparadas diluições seriadas até se obterem amostras com concentrações de 10^{-3} a 10^{-8} da amostra original. Todos os controlos foram conservados a -70°C .

2.3. Extracção do RNA viral

A extracção do RNA viral foi executada a partir das zaragatoas nasais utilizando o MagMAX™ AI/ND Viral RNA Isolation Kit (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante. A extracção decorreu na sala de culturas após descontaminação da sala e da câmara de Fluxo Laminar, por irradiação UV durante 30 minutos (irradiação da sala e da câmara de Fluxo com sistemas dedicados e independentes).

Após preparação dos reagentes do Kit de extracção de acordo com as instruções do fabricante, procedeu-se à extracção do RNA. Para tal, após a descongelação das amostras à temperatura ambiente, estas foram vortexadas vigorosamente durante 30 segundos. Com a ajuda de uma pinça inverteu-se a zaragatoa e após nova agitação no vortex durante 30 segundos, recolheu-se a suspensão da amostra por centrifugação, descartando a zaragatoa. Adicionou-se então à suspensão da amostra, 802 µL de *Viral Lysis/Binding solution*, e após nova agitação no vortex (30 segundos) fez-se uma breve centrifugação para remover as gotas da parede e da tampa do *ependorf*. Adicionou-se então 20 µL da suspensão de *beads* (ressupensa em vortex imediatamente antes de ser utilizada) e após agitação em vortex manteve-se os tubos com agitação moderada durante 4 minutos. Após uma breve centrifugação para recolher os restos da suspensão das paredes e tampa do *ependorf*, com a ajuda de um magneto capturou-se as *beads*

durante 3 minutos e descartou-se a solução. Procedeu-se a sucessivas lavagens das *beads*. Primeiro uma vez com 400 µL de *Wash Solution 1*, e depois duas vezes com 200 µL de *Wash Solution 2*. Depois de um breve passo para secar ligeiramente as *beads* ao ar 2 minutos, e tendo verificado que os *ependorfs* ficaram sem vestígios de solução, a Eluição do RNA foi feita com 50 µL de *Elution Buffer* vortexando vigorosamente durante 3 minutos. Com a ajuda do magneto descartaram-se as *beads* magnéticas e recolheu-se o sobrenadante com o RNA para outros *ependorfs* devidamente identificados. Congelou-se o RNA a -70° até à sua utilização no RT-PCR.

2.4. Amplificação

A amplificação fez-se em duas fases através da técnica de Semi-Nested-RT-PCR-em-Tempo-Real no Termociclador-em-Tempo-Real LightCycler (Roche).

O RT-PCR-em-Tempo-Real foi realizado com concentrações dos *primers* OS e OAS equimolares de 0,25µM, a desnaturação ocorreu a 95°C durante 5 segundos, hibridação dos *primers* a 50°C durante 40 segundos e a extensão a 72°C durante 40 segundos. A rampa utilizada neste ensaio foi de 5°C/s e a aquisição de fluorescência decorreu no final da fase de amplificação a 85°C.

O segundo passo da amplificação, o Semi-Nested-PCR-em-Tempo-Real foi realizado com uma concentração de *primer* OAS de 0,5 µM e de *primer* IS RhvA_B de 0,25 µM. A desnaturação ocorreu a 94°C durante 10 segundos, a hibridação ocorreu a 60°C durante 15 segundos e a extensão a 72°C durante 30 segundos. Usou-se uma rampa de 20°C/s e um volume de amostra de 2,5 µL.

2.5. Inquéritos

Para a recolha de dados não laboratoriais, no presente estudo optou-se pela utilização de questionários (Anexo II) aos voluntários que participaram neste estudo. Estes foram elaborados todos os meses juntamente com a colheita. O questionário foi elaborado de acordo com os objectivos do estudo.

2.6. Análise Estatística

Para a prossecução da análise estatística dos dados recolhidos foi criada uma base de dados no programa informático SPSS (versão 16.0). A análise estatística desta investigação respeitou a natureza das variáveis e as suas especificidades. Assim, foram aplicados testes paramétricos (análise descritiva e teste de hipóteses) somente nas situações em que as variáveis cumpriam os pré-requisitos estabelecidos (variáveis quantitativas, contínuas e com homogeneidade de variâncias). Nos restantes casos, aplicou-se estatística não paramétrica (análise de frequências). As figuras apresentadas foram criadas recorrendo ao Microsoft Excel.

3. Resultados

3.1. Dados Pessoais

Os dados recolhidos referem-se às colheitas e respectivos questionários obtidos de 17 indivíduos (n=17) todos estudantes com idades compreendidas entre os 17 e os 27 anos (mediana de 20 anos; Fig. 28). Apenas 3 indivíduos pertencem ao género Masculino (tabela XI), enquanto os restantes 14 são do género Feminino.

Tabela XI – Distribuição da amostra por género.

Género	N	%
Masculino	3	17,6
Feminino	14	82,4
Total	17	100,0

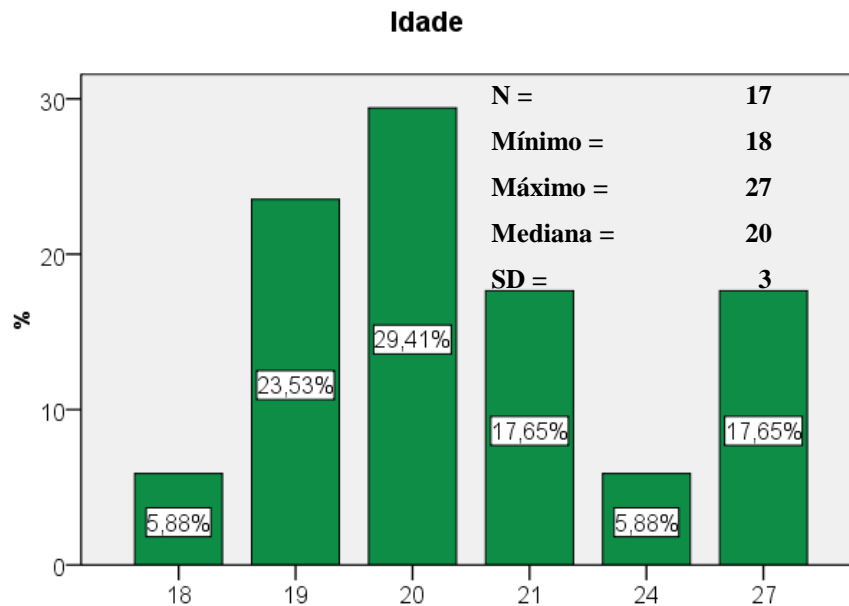


Fig. 28 Distribuição da amostra por idades.

3.2. Dados relativos a patologias/alergias descritas no inquérito.

No que diz respeito a patologias e/ou alergias que os indivíduos referiram ter, 1 indivíduo (5,9%) referiu ter Asma (tabela XII), sucedendo o mesmo para a alergia de pele e alimentar (tabela XII). Nenhum dos indivíduos estudados referiu possuir Alergia a Medicamentos ou a Insectos (tabela XII). Quando questionados quanto à presença de Outras Alergias, 2 indivíduos (11,8%) referiam ter Rinite Alérgica (Fig. 29), e um sujeito (5,9%) Alergia ao pó ou polen (Fig. 29) enquanto 82,4% referiram a presença de outras Alergias não especificadas (Fig. 29).

Tabela XII – Distribuição da amostra quanto à presença de asma, alergia de pele, alergia alimentar, alergia a medicamentos e alergia a insectos.

	Não n (%)	Sim n (%)	Total N
Asma	16 (94,1%)	1 (5,9%)	17
Alergia de Pele	15 (93,8%)	1 (6,2%)	16
Alergia Alimentar	15 (93,8%)	1 (6,2%)	16
Alergia Medicamentos	16 (100%)	0	16
Alergia Insectos	16 (100%)	0	16

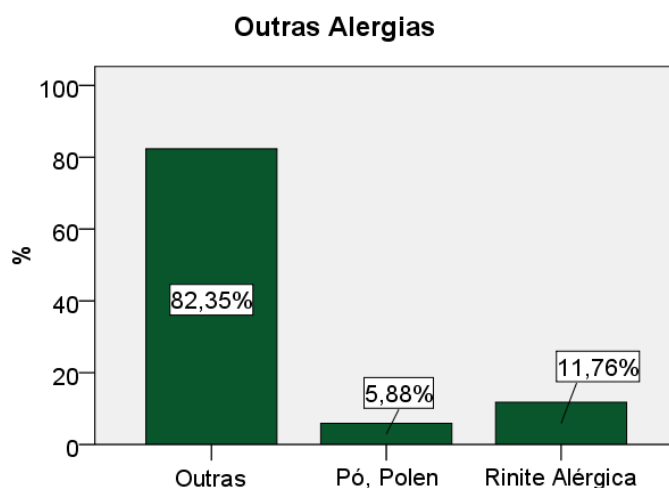


Fig. 29 Distribuição da amostra quanto à presença de outras alergias.

3.3. Sazonalidade do *Rhinovirus*

Quando se avalia a sazonalidade quanto à presença de *Rhinovirus* ao longo do ano, verificou-se que este foi detectado durante todo o ano, ainda que com maior prevalência nos meses mais frios, isto é, de Outubro a Março, com o seu pico máximo em Janeiro (Fig. 30). No mês de Julho parece também verificar-se um aumento da prevalência do vírus porém, este dado pode ser enganador já que, o número de amostras colhidas nesse mês é bastante reduzido (n=5) (Fig. 30).

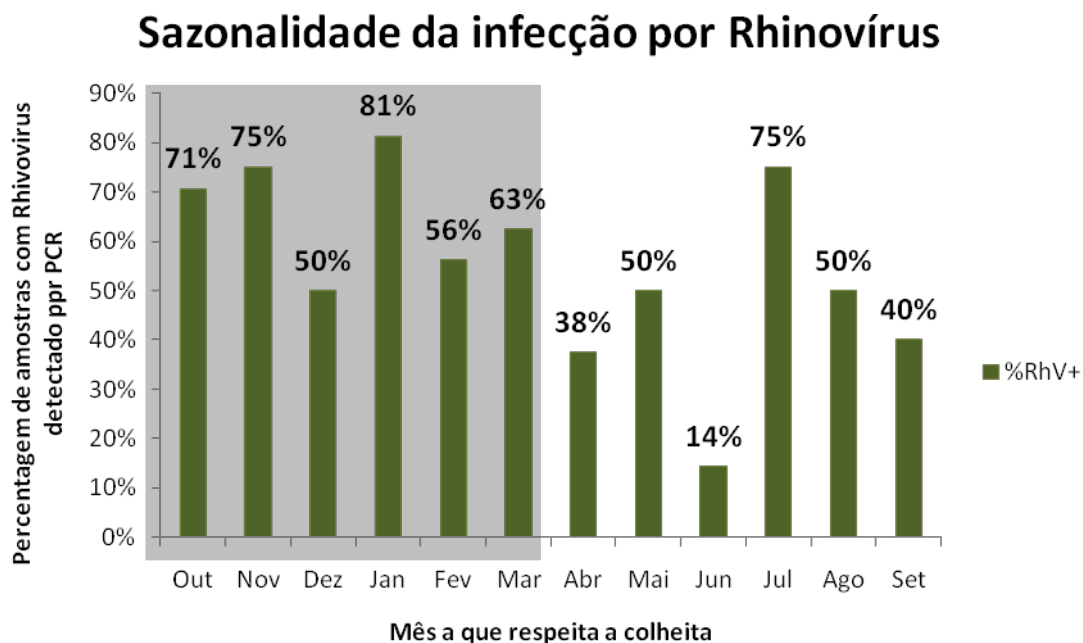


Fig. 30 Sazonalidade do *Rhinovirus* (o sombreado assinala o período que para efeitos deste estudo foi considerado período de meses frios).

A análise da sazonalidade feita individuo a indivíduo mostra ser muito variável. Verifica-se que todos os indivíduos desta amostra têm pelo menos duas e, frequentemente, quatro ou mais colheitas com presença de *Rhinovirus*, com excepção do indivíduo U07 que apenas realizou uma colheita (Fig. 31).



Fig. 31 Sazonalidade da presença de *Rhinovirus* em cada indivíduo. A verde encontram-se os meses em que não foi detectada a presença de *Rhinovirus*, a vermelho os meses em que o *Rhinovirus* foi detectado. A sombreado encontram-se os meses frios do ano.

Nas primeiras quatro linhas encontram-se os indivíduos que apresentam *Rhinovirus* nos meses frios e nos meses quentes, enquanto nas últimas duas linhas se encontram os dados relativos aos indivíduos que apenas revelaram a presença de *Rhinovirus* nos meses frios.

O indivíduo U007 apenas forneceu uma amostra e está representado entre os dois grupos.

Pode observar-se nas primeiras quatro linhas da figura 22 os indivíduos que têm *Rhinovirus* nos meses de Inverno e de Verão (Fig. 31). Na quinta linha observa-se o indivíduo U07 que apenas realizou uma colheita durante todo o ano que também foi positiva para *Rhinovirus* (Fig. 31).

Nas duas últimas linhas podem observar-se os indivíduos que apenas tiveram *Rhinovirus* nos meses de Inverno (Fig. 31).

De uma forma geral, observou-se que o *Rhinovirus* foi detectado durante todo o ano. Com efeito apenas no mês de Agosto não foi detectado *Rhinovirus* em nenhum indivíduo, mas trata-se de um mês em que apenas foi possível efectuar colheitas ao indivíduo U18, o qual nunca apresentou *Rhinovirus* nos meses de verão. Embora tenha havido uma afluência de colheitas maior nos meses mais frios (de Outubro a Março), o que pode influenciar estes resultados, pode observar-se uma maior prevalência de *Rhinovirus* durante esses meses (Fig. 31).

3.4. Sintomatologia

Quando se analisa a correlação entre os sintomas que cada indivíduo manifestou durante o mês da colheita e as amostras que foram positivas para o *Rhinovirus*, verifica-se que quando são relatados mais sintomas (6 e 7 sintomas) é mais frequente a detecção de *Rhinovirus* nas amostras recolhidas (Fig. 32).

A presença de *Rhinovirus* nos indivíduos que referiram ter a presença de zero, um, dois ou três sintomas não diferiu muito (Fig. 32). Paradoxalmente, os casos em que são relatados quatro ou cinco sintomas, estão associados à menor detecção de *Rhinovirus* (44% e 33% respectivamente; Fig. 32). A presença de *Rhinovirus* atinge então o seu máximo nos indivíduos que referem ter seis ou sete sintomas (Fig. 32).

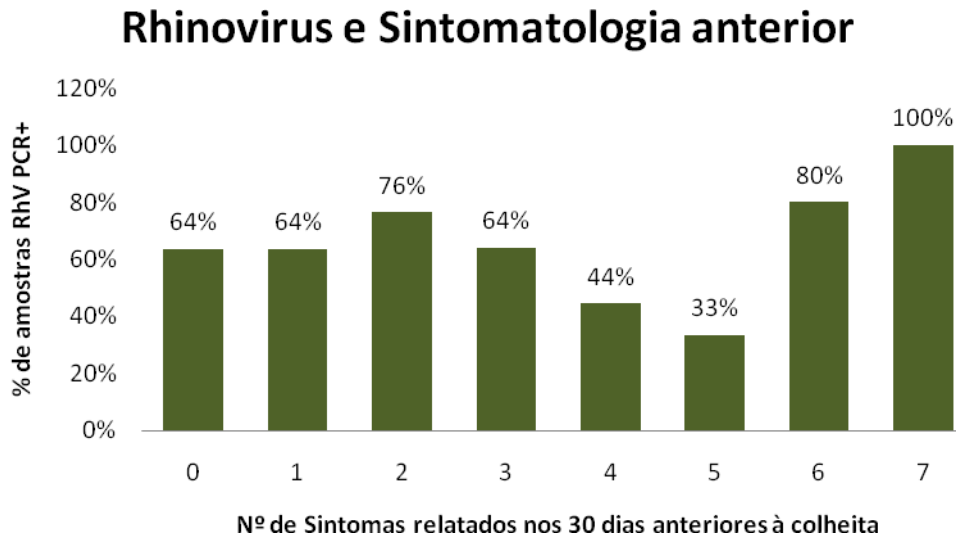


Fig. 32 Correlação entre os sintomas manifestados no mês da colheita e as amostras positivas para *Rhinovirus*.

Como a detecção de *Rhinovirus*, realizada por PCR em tempo real, é muito sensível, é teoricamente possível que esta ocorra antes de surgirem os sintomas, o que pode introduzir um facto de erro na análise anteriormente efectuada.

Assim, e uma vez que a sintomatologia registada nos inquéritos se referia aos 30 dias anteriores à colheita da amostra decidimos reanalisar os dados incluindo os sintomas nos 30 dias anteriores e 30 dias posteriores à colheita (Fig. 33).

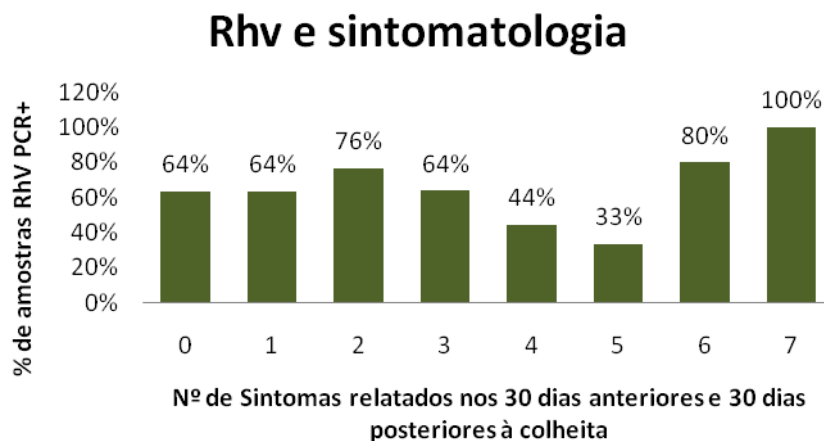


Fig. 33 Correlação entre os sintomas manifestados no mês da colheita e no mês seguinte e das amostras positivas para *Rhinovirus*.

Os resultados desta análise foram equivalentes aos da análise anterior confirmando-se assim que na generalidade dos casos, em que a presença de *Rhinovirus* está associada a manifestações clínicas, estas são relatadas no momento da colheita mensal (Fig. 33).

Uma vez que a presença de alergias pode ser um facto perturbador da associação entre a presença de *Rhinovirus* e a sintomatologia, optou-se por analisar apenas indivíduos que não referiram possuir alergias identificadas. Quando, em indivíduos não alérgicos, se procurou a relação entre cada sintoma e a presença de *Rhinovirus*, não se observou grande concordância entre a presença dos sintomas e a presença de *Rhinovirus* (tabelas XIII e XIV).

Foram realizadas duas análises para os indivíduos não alérgicos que referiam ter sintomatologia. Numa primeira análise, procurou-se a relação entre a presença de *Rhinovirus* nos indivíduos com os sintomas sentidos nos 30 dias anteriores à colheita. Posteriormente, e à semelhança da análise que foi feita para a figura 33, analisou-se a relação entre a presença do *Rhinovirus* nestes indivíduos e os sintomas manifestados nos 30 dias anteriores e os 30 dias posteriores à colheita.

Na primeira análise foram correlacionados diferentes sintomas referentes ao mês da colheita (tabela XIII) face a presença de *Rhinovirus*. Para nenhum dos sintomas a correlação com a presença do vírus foi estatisticamente significativa (tabela XIII).

Tabela XIII – Correlação entre os sintomas de indivíduos não alérgicos referentes ao mês em que foi realizada a colheita e da presença de *Rhinovirus* ou não nessas amostras.

Sintomas	PCR <i>Rhinovirus</i>	N		%	Pearson χ^2
		Não	Sim		
Espirros	Neg.	21	24	53%	0,058
	Pos.	44	24	35%	
Pingo nariz	Neg.	14	31	69%	n.s.
	Pos.	25	43	63%	
Nariz entupido	Neg.	16	29	64%	0,096
	Pos.	35	33	49%	
Dores cabeça	Neg.	12	33	73%	n.s.
	Pos.	26	42	62%	
Lacrimação/Prurido	Neg.	39	5	11%	0,076
	Pos.	51	17	25%	
Perda de Olfacto/Sabor	Neg.	42	3	7%	n.s.
	Pos.	62	6	9%	
Prurido Nariz	Neg.	37	8	18%	n.s.
	Pos.	47	21	31%	
Associação Nariz/olhos	Neg.	37	8	18%	n.s.
	Pos.	62	6	9%	

Curiosamente, ao contrário do que seria de esperar, observou-se uma tendência ($p < 0,058$) para a presença de espirros ser menor em indivíduos com *Rhinovirus* (tabela XIII). Observou-se essa mesma tendência ($p < 0,96$) para a presença de nariz entupido nos indivíduos que tinham *Rhinovirus* (tabela III). Nos indivíduos com presença de Lacrimação/Prurido observou-se uma tendência contrária ($p < 0,076$). Os indivíduos com *Rhinovirus* tinham maior presença de Lacrimação/Prurido (tabela XIII).

Quando se analisa a presença de *Rhinovirus* em indivíduos não alérgicos, que referem sintomas do mês da colheita e do mês seguinte, de forma semelhante à análise anterior não se obtêm diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos sintomas inquiridos (tabela XIV).

Tabela XIV – Correlação entre os sintomas referentes a indivíduos não alérgicos do mês anterior e mês seguinte à realização da colheita e da presença de *Rhinovirus* ou não nessas amostras.

Sintomas	PCR <i>Rhinovirus</i>	N		%	Pearson X^2
		Não	Sim		
Espirros	Neg.	15	30	67%	0,08
	Pos.	34	34	50%	
Pingo nariz	Neg.	7	38	84%	n.s.
	Pos.	15	53	78%	
Nariz entupido	Neg.	11	34	76%	0,093
	Pos.	27	41	60%	
Dores cabeça	Neg.	4	41	91%	0,046
	Pos.	16	52	76%	
Lacrimação/Prurido	Neg.	33	11	25	n.s.
	Pos.	47	21	31	
Perda de Olfacto/Sabor	Neg.	41	4	9%	n.s.
	Pos.	56	12	18%	
Prurido Nariz	Neg.	29	16	36%	n.s.
	Pos.	42	26	38%	
Associação Nariz/olhos	Neg.	31	14	31%	0,061
	Pos.	57	11	16%	

Observou-se também aqui, uma tendência para a presença de espirros ($p < 0,08$), nariz entupido ($p < 0,093$), dores de cabeça ($p < 0,046$) e associação dos sintomas ao nariz e olhos ($p < 0,061$) ser menor em indivíduos com *Rhinovirus* (tabela XIV).

3.5. Reinfecções

Quando se analisou o número de infecções que cada indivíduo teve durante os meses em estudo, observou-se que todos os indivíduos tinham pelo menos uma reinfecção durante este período. O máximo de reinfecções que os indivíduos apresentaram neste período foi três infecções (Fig. 34).

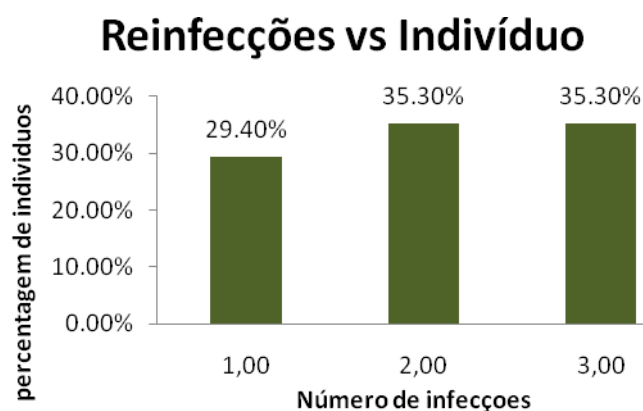


Fig. 34 Frequência com que surgem reinfecções por *Rhinovirus*, no mesmo indivíduo ao longo de um ano de "Follow-up".

Observou-se que durante o período em estudo 5 indivíduos (29.4%) apenas apresentaram uma infecção, enquanto os restantes 12 (70.6%) apresentaram reinfecções. Só foram claramente observadas 1 ou 2 reinfecções, e estas apresentaram igual frequência (6 indivíduos ou 35.3%) (Fig. 34).

3.6. Análise climatológica

Tendo em conta a evidente relação entre a sazonalidade e a presença de *Rhinovirus* procurou-se analisar diferentes variáveis climatológicas para se compreender de que forma essas variáveis podem ou não ser relevantes na infecção por *Rhinovirus*.

Através dos boletins climatológicos mensais (<http://www.meteo.pt/pt/publicacoes/tecnico-cientif/noIM/boletins/index.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&cmbAno=2009&idDep=cli&idTema=pcl&curAno=2009>)

obtiveram-se os seguintes dados referentes ao período de estudo nos anos de 2009 e 2010: temperaturas absolutas, máxima e mínima mensal; temperaturas médias máximas e mínimas mensais; precipitação máxima diária e precipitação total mensal. Seria também útil analisar os dados relativos à humidade do ar porém estes não se encontraram disponíveis nos referidos relatórios. Através das temperaturas máximas e mínimas de cada mês calculou-se a média das temperaturas mensais (tabela XV).

Tabela XV – Dados climatológicos de 2009 e 2010.

Ano	Mês	Temperatura (°C)		Precipitação Máx. Diária (mm) ^{a)}	Temperatura (°C)			Precipitação Total Mês (mm) ^{a)}
		Máx. Ocorrida ^{a)}	Min. Ocorrida ^{a)}		Máx. Mês ^{a)}	Min. Mês ^{a)}	Média Mês ^{b)}	
2009	Out	30,4	9,2	36,8	23,1	15,1	19,1	102
2009	Nov	21,4	4,7	85	16,6	11,1	13,85	301,5
2009	Dez	18	0,1	41,3	14,2	7	10,6	302,5
2010	Jan	17,3	-1,7	35,3	12,8	6,4	9,6	147,3
2010	Fev	18,1	-0,1	32,7	13,7	6,6	10,15	146,4
2010	Mar	20,2	2,4	33,9	15,3	8,3	11,8	165,4
2010	Abr	26,6	4	16,4	20,3	11,3	15,8	48
2010	Mai	32,7	5,3	19,6	20,5	12	16,25	49
2010	Jun	30,9	10,9	37,2	22,6	14,4	18,5	53,8
2010	Jul	37,5	11,6	1,5	26,4	16,6	21,5	4,1
2010	Ago	35,1	13,7	3,1	26,9	16,6	21,75	4,2
2010	Set	36,3	10,1	6,3	24,6	15,4	20	13,9

a) Dados obtidos através dos boletins climatológicos mensais disponíveis em: <http://www.meteo.pt/pt/publicacoes/tecnico-cientif/noIM/boletins/index.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&cmbAno=2009&idDep=cli&idTema=pcl&curAno=2009>.

b) Média das Temperaturas Máximas do Mês e Mínimas do Mês.

Através do relatório sazonal da época de inverno de 2009/2010 (<http://www.meteo.pt/pt/publicacoes/tecnico-cientif/noIM/boletins/index.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&cmbAno=2009&idDep=cli&idTema=pcl&curAno=2009>) constatou-se que a média das temperaturas máximas para essa época foi de 13,9°C. Com este dado fez-se uma análise da presença de *Rhinovirus* para temperaturas inferiores ou iguais a 13,9°C e superiores a 13,9°C.

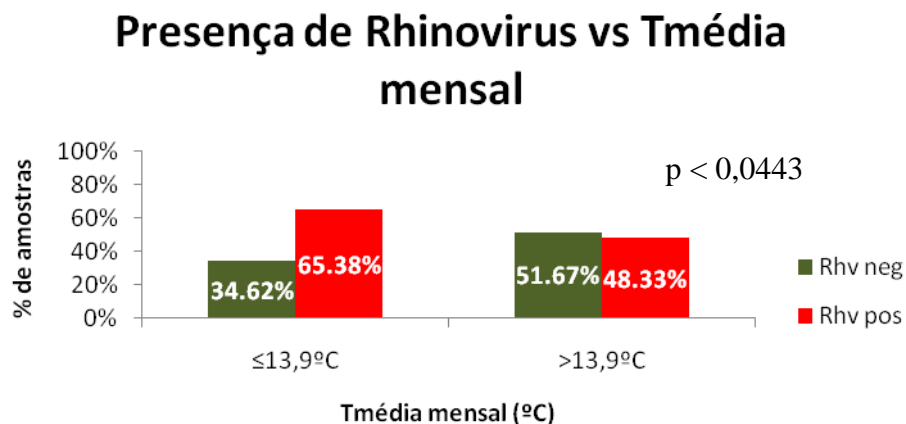


Fig. 35 Presença de *Rhinovirus* para temperaturas médias mensais inferiores ou iguais a 13,9°C e superiores a 13,9°C.

Verificou-se a existência de diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0443$) na frequência de amostras com *Rhinovirus* em função da temperatura média mensal. Com efeito, como se pode observar na Fig. 35, As amostras recolhidas em períodos com Temperatura média inferior a 13,9°C apresentam *Rhinovirus* mais frequentemente do que ocorre nos meses mais quentes (Fig. 35). Verificou-se ainda que os meses a que correspondeu esta maior frequência são os meses de Novembro, Dezembro, Janeiro, Fevereiro e Março.

Quando se correlaciona a percentagem de *Rhinovirus* para as temperaturas absolutas, correspondentes aos extremos máximos e mínimos de cada mês, não se observou qualquer tendência (figuras 36 e 37).

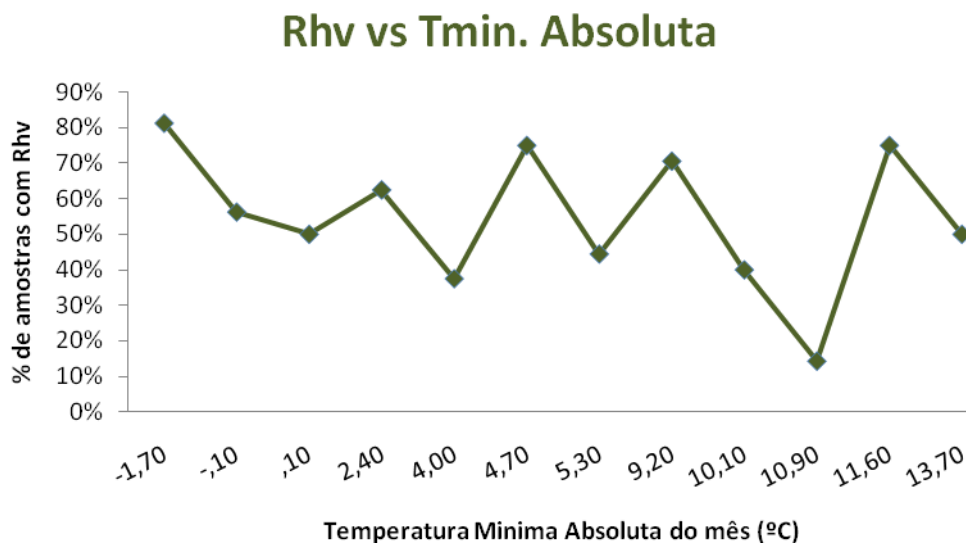


Fig. 36 Correlação da presença de *Rhinovirus* com as temperaturas mínimas absolutas.

A percentagem de *Rhinovirus* face às temperaturas absolutas mínimas variou sem nenhuma tendência evidente (Fig. 36), destacando-se a presença de três picos de temperatura para os quais a percentagem de *Rhinovirus* foi elevada: aos 4,7°C; aos 9,2°C e aos 11,6°C (Fig. 36).

À semelhança do que se observou com as temperaturas mínimas absolutas, não se observou qualquer tendência para a correlação entre a percentagem de *Rhinovirus* e as temperaturas máximas absolutas. De igual forma destacam-se alguns picos de

temperatura para os quais a percentagem de *Rhinovirus* é mais elevada: aos 21,4°C, 30,40°C e 37,5°C (Fig. 37).

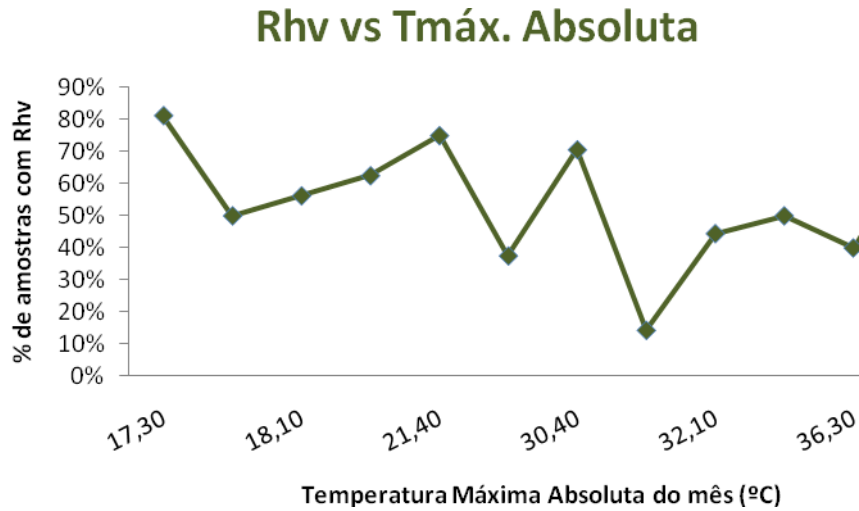


Fig. 37 Correlação da presença de *Rhinovirus* com as temperaturas máximas absoluta. Com o objectivo de compreender o comportamento do *Rhinovirus* com as temperaturas globais que ocorreram ao longo do ano correlacionou-se a Temperatura média mensal com a frequência de amostras positivas para *Rhinovirus* (Fig. 38). Não se observou qualquer tendência para esta correlação porém destacam-se três picos de temperatura para os quais a percentagem de *Rhinovirus* é mais elevada. Estes picos de temperatura situam-se nos 9,6°C, 13,85°C, 19,10°C e 21,5°C (Fig. 38).

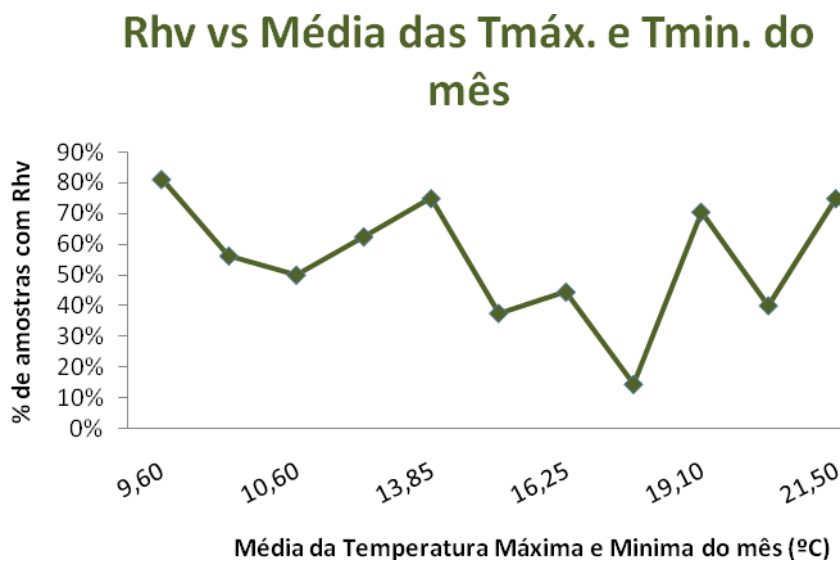


Fig. 38 Correlação da presença de *Rhinovirus* com a Temperatura média mensal.

4. Discussão

Através dos dados recolhidos de 17 estudantes, na sua maioria do género feminino relativamente à sazonalidade do *Rhinovirus*, observou-se que o *Rhinovirus* não só está presente durante todo o ano, como a infecção parece ser na maioria das vezes recorrente, no mesmo ano. Apesar de a participação no estudo por parte dos estudantes voluntários ter sido maior nos meses de Inverno, e este facto poder de algum modo distorcer a realidade estatística, observamos uma maior prevalência do vírus nos meses de inverno, isto é, de Outubro a Março o que é compatível com a literatura. O mês de Julho, com apenas 5 colheitas, é um bom exemplo, de como a quantidade de amostras pode comprometer os resultados obtidos. Neste mês, observamos uma elevada percentagem de amostras positivas para *Rhinovirus*. Porém, o reduzido número de amostras pode estar a condicionar fortemente este resultado. Também no mês de Agosto, em que apenas o indivíduo U18 realizou colheita, o número de amostras disponíveis torna impossível qualquer análise.

Devido à enorme sensibilidade teórica da técnica de Semi-Nested-RT-PCR-em-Tempo-Real, era teoricamente possível que a detecção do *Rhinovirus* pudesse anteceder a presença de sintomas, não porque estes não existissem, mas porque o tempo de incubação ainda não tivesse sido atingido. Por este motivo, analisamos a relação entre a presença de sintomas e a presença de *Rhinovirus* de duas formas distintas. Num caso incluímos apenas os sintomas presentes até 30 dias antes da colheita e noutra caso os sintomas presentes numa janela de 60 dias (30 dias anteriores e 30 dias posteriores à colheita). Os resultados obtidos indicam que é possível observar uma maior frequência de amostras com *Rhinovirus* em indivíduos que relatavam apresentar 6 ou 7 sintomas, tanto quando estes se referiam aos 30 dias anteriores à colheita, como quando este período se estendia também para os 30 dias subsequentes. Desta forma, podemos concluir que na maioria dos casos, a detecção do vírus não parece ser anterior ao aparecimento de sintomatologia.

Como alguma da sintomatologia associada à infecção por *Rhinovirus* pode também ocorrer com fenómenos alérgicos, em particular nos casos das alergias respiratórias e sinusite, o inquérito procurava identificar os voluntários que poderiam possuir estas

patologias crónicas. Quando estes indivíduos foram excluídos da análise, e se indagou a correlação entre cada sintoma relatado e a presença de *Rhinovirus*, paradoxalmente foi observado uma tendência (estatisticamente não significativa) para os indivíduos que referiam apresentar espirros e nariz entupido apresentarem menos frequentemente *Rhinovirus* (tabela XIII). Também a presença de lacrimação e prurido apresentava uma tendência estatisticamente não significativa, mas neste caso a frequência de amostras com *Rhinovirus* era maior nos indivíduos que referiam a presença do sintoma. Quando os sintomas analisados se referem ao período alargado (30 dias antes e 30 dias pós colheita), mantém-se a paradoxal tendência observada para os espirros e nariz entupido, surge uma tendência semelhante para a associação de sintomatologia no nariz e nos olhos, e surge uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.046$) do mesmo teor paradoxal para o sintoma dores de cabeça (tabela XIV). Assim, não parece haver uma correlação estatística consistente entre a presença de sintomas isolados e a infecção por *Rhinovirus*. Tal pode não ser de estranhar se tivermos em conta a inespecificidade dos sintomas, e o grande leque de situações que os podem originar. Assim, não deixa de ser significativo que a única relação estatisticamente consistente que encontramos fosse com a associação de 6 ou mais sintomas, já que esta poderá ser muito mais específica da infecção por *Rhinovirus* do que qualquer sintoma isolado.

Um outro aspecto particularmente relevante que o desenho do presente estudo pode responder diz respeito à análise das reinfecções por *Rhinovirus*. Ainda que na presente fase de estudo do projecto, não nos seja possível avaliar se as reinfecções se fazem por estirpes iguais ou diferentes, da mesma espécie ou de espécies de *Rhinovirus* diferentes, é no entanto possível avaliar a frequência com que cada indivíduo se reinfecta ao longo de um ano. Uma vez mais, o estado precoce do projecto (em que apenas 17 dos 36 indivíduos de que colhemos amostras estão estudados, e em que para alguns indivíduos não foi possível estudar a totalidade das amostras por razões orçamentais), não nos permite apresentar conclusões definitivas, já que dispomos de um reduzido número de indivíduos, e para alguns de apenas uma parte das amostras estudadas. Contudo os resultados disponíveis indicam que todos os indivíduos tiveram pelo menos uma infecção durante este período e, que a maioria dos indivíduos (12 em 17) apresentou uma ou duas reinfecções (6 indivíduos em cada caso; Fig. 25).

Como é da sabedoria popular, e os dados já discutidos suportam, as constipações parecem ser mais frequentes nos meses de Inverno. Uma das possibilidades para explicar esta tendência relaciona-se com as diferentes condições climáticas. Para testar este facto, recolhemos e sistematizamos os dados climatológicos do Porto, disponíveis nos Boletins Climatológicos Mensais do Instituto Português de Meteorologia e Geofísica e procuramos a sua relação com a frequência com que encontramos *Rhinovirus* nas amostras recolhidas aos voluntários. Os dados obtidos permitiram-nos encontrar uma relação estatisticamente significativa entre a temperatura média mensal e a frequência de *Rhinovirus*: o *Rhinovirus* é mais frequente quando a temperatura média mensal é igual ou inferior a 13,9°C (as mesmas frequências foram encontradas para o valor de corte mais intuitivo de 14°C, mas mantivemos o valor de 13.9°C por este corresponder à temperatura média máxima dos meses de Inverno segundo o Relatório sazonal da época de Inverno 2009/2010 do Instituto Português de Meteorologia).

Os restantes dados climatológicos recolhidos (Temperatura máxima e Mínima absoluta do mês, e Precipitação Máxima diária e Precipitação Total Mensal) não apresentaram qualquer relação estatisticamente significativa com a frequência de *Rhinovirus*. Uma vez mais convém realçar que o reduzido número de amostras pode não nos permitir encontrar todas as relações relevantes entre os dados, pelo que não podemos excluir em absoluto que a continuidade do estudo venha a revelar relações por enquanto não evidentes.

A observação da frequência de *Rhinovirus* em função das Temperaturas mínima e máxima absolutas (Figs. 27 e 28) apesar de não revelar tendências lineares de comportamento, indica no entanto a existência de picos de frequência, que quando associados aos meses em que ocorreram revela que os picos ocorreram sempre no Inverno (Outubro, Novembro e Janeiro) existindo ainda um pico adicional no mês de Julho. Como já discutido anteriormente, este último pico que ocorre não só nas Temperaturas mínimas e máximas absolutas, mas também nas temperaturas médias mensais poderá não ter qualquer significado devido ao reduzido número de amostras estudadas neste mês. Parece pacífico que nos meses de Outubro e Novembro ocorra este aumento de *Rhinovirus* já que, apesar de não corresponderem aos meses mais frios, são no entanto os meses de transição entre o Verão e o Inverno, o que poderá ser

significativo nas adaptações térmicas a que o organismo Humano se encontra sujeito. Também aqui parece haver uma estreita relação entre o saber popular, e os dados observados.

5. Conclusão

Em conclusão, o presente estudo, permitindo fazer um “*Follow-up*” contínuo dos mesmos voluntários ao longo do ano permitiu responder a um leque mais alargado de questões do que seria possível com estudos não longitudinais que apenas se poderiam basear nas frequências em cada momento. Contudo, a fase precoce em que o estudo se encontra, bem como os muito limitados recursos económicos disponíveis para o estudo limitaram fortemente o alcance do mesmo. Com efeito, apesar de o estudo ter envolvido um número significativo de amostras (138 amostras), este número quando distribuído pelos 12 meses do estudo reduz significativamente o poder estatístico dos dados recolhidos. Também a variável adesão da população alvo do estudo (estudantes Universitários muitas vezes deslocadas das suas zonas de residência em férias), comprometeu de algum modo a consistência das conclusões obtidas, e reforça a necessidade de prosseguir o estudo completando a análise à totalidade dos voluntários envolvidos, à totalidade das amostras disponíveis para estes voluntários, e se possível alargar o estudo no tempo, incluindo inclusivamente novas populações alvo como as populações em maior risco clínico com esta infecção (asmáticos e idosos).

Parte IV

Conclusão

A optimização de um protocolo com a técnica Semi-Nested-RT-PCR-em-Tempo-Real para detecção específica e sensível de *Rhinovirus* do tipo A e B revelou-se eficiente para concentrações virais até 10^{-7} . Sendo o RT-PCR-em-Tempo-Real realizado em 40 ciclos com concentrações dos *primers* OS e OAS equimolares de 0,25 μ M, a desnaturação ocorreu a 95°C durante 5 segundos, a hibridação dos *primers* a 50°C durante 40 segundos e a extensão a 72°C durante 40 segundos. A rampa utilizada neste ensaio foi de 5°C/s e a aquisição de fluorescência decorreu no final da fase de amplificação a 85°C. Seguindo-se do Semi-Nested-PCR-em-Tempo-Real também realizado em 40 ciclos com uma concentração de *primer* OAS de 0,5 μ M e de *primer* IS RhvA_B de 0,25 μ M. A desnaturação ocorreu a 94°C durante 10 segundos, a hibridação ocorreu a 60°C durante 15 segundos e a extensão a 72°C durante 30 segundos. A aquisição de fluorescência foi igualmente feita no final da fase de amplificação a 85°C.

Aplicado este protocolo às amostras colhidas e feito o tratamento estatístico dos resultados obtidos através da execução deste protocolo bem como do questionário aplicado aos voluntários em cada colheita pode concluir-se que o *Rhinovirus* se encontra presente durante todo o ano observando-se uma maior prevalência do vírus nos meses de Inverno, isto é, de Outubro a Março.

Observou-se uma maior frequência em indivíduos que relatavam apresentar 6 ou 7 sintomas quer quando estes sintomas se referiam aos 30 dias antes da colheita como quando este período se estendia também para os 30 dias posteriores a ela. Descartando assim a hipótese de que o vírus poderia estar a ser detectado antes do aparecimento dos sintomas.

Relativamente às infecções que cada indivíduo teve durante o “*Follow-up*”, todos os indivíduos tiveram pelo menos uma infecção durante este período e a maioria dos indivíduos teve uma ou duas reinfecções no mesmo período. Seria no entanto interessante avaliar numa fase posterior se estas reinfecções são causadas pelas mesmas espécies ou espécies diferentes de *Rhinovirus*.

Conclui-se também com o presente estudo que o *Rhinovirus* é mais frequente para temperaturas médias mensais iguais ou inferiores a 13,9°C neste período de estudo. Com as temperaturas absolutas mínimas e máximas mensais pode constatar-se que os picos de temperatura em que a frequência de *Rhinovirus* é maior correspondem a meses de Inverno. Destes meses destacam-se as frequências observadas nos meses de Outubro e de Novembro que, não correspondendo aos meses mais frios do período em estudo, são no entanto os meses de transição entre o Verão e Inverno.

O presente estudo permitiu fazer um “*Follow-up*” contínuo dos mesmos voluntários ao longo do ano respondendo assim a um leque mais alargado de questões do que seria possível com estudos não longitudinais que apenas se poderiam basear nas frequências em cada momento. Contudo, a fase precoce em que o estudo se encontra, bem como os muito limitados recursos económicos disponíveis para o estudo limitaram fortemente o alcance do mesmo. É de salientar que devido aos limitados recursos económicos dos 36 voluntários que realizaram colheitas ao longo deste ano apenas foram tratadas amostras e dados correspondentes a 17 indivíduos. Apesar de o estudo ter envolvido um número significativo de amostras (148 amostras), este número quando distribuído pelos 12 meses do estudo reduz significativamente o poder estatístico dos dados recolhidos. Também a variável adesão da população alvo do estudo (estudantes Universitários muitas vezes deslocadas das suas zonas de residência em férias), comprometeu de algum modo a consistência das conclusões obtidas, e reforça a necessidade de prosseguir o estudo completando a análise à totalidade dos voluntários envolvidos, à totalidade das amostras disponíveis para estes voluntários, e se possível alargar o estudo no tempo, incluindo inclusivamente novas populações alvo como as populações em maior risco clínico com esta infecção (asmáticos e idosos).

Por tudo o que já foi dito, parece evidente que o presente estudo, apesar de incluir resultados muito interessantes, deverá ter continuidade no tempo. Esta continuidade deve aprender com as limitações agora encontradas, procurando limitá-las no futuro. Uma destas limitações prende-se com a forma como o questionário foi desenvolvido. Com efeito foram encontradas alguns pontos que poderão sofrer melhorias que permitam uma melhor análise dos dados: 1) As respostas deverão preferencialmente utilizar uma escala discreta de 5 pontos e não apenas respostas bimodais Sim/Não; 2)

Durante as colheitas tornou-se evidente que as questões número 8 e 9 foram interpretadas de forma diferente do que se pretendia. Os voluntários apenas responderam à questão 9 quando tinha respondido sim à questão 8 e o objectivo inicial do questionário era tratar os dados destas duas questões de forma distinta. Este facto deve passar a estar mais evidente no questionário.

Parte IV

Bibliografia

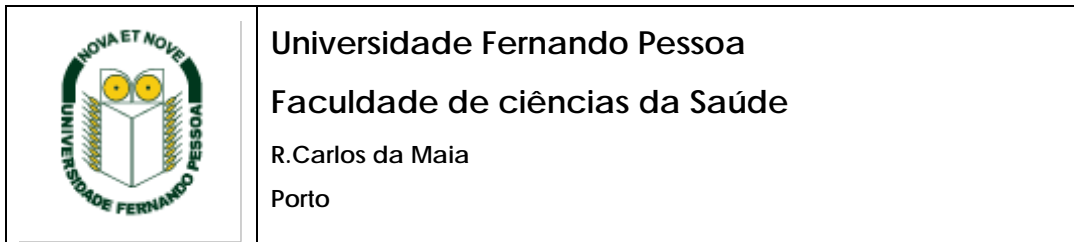
1. Anzueto, A., Niederman, M. S. (2003). Diagnosis and Treatment of *Rhinovirus* Respiratory Infections, *Chest*, 123, pp. 1664-1672.
2. Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, pp. 169-193.
3. Cordey, S., Gerlach, D., Junier, T., Zdobnov, E. M., Kaiser, L., Tapparel, C. (2008). The *cis-acting* replication elements define human enteovirus and *Rhinovirus* species, *RNA* 2008, 14, pp. 1568-1578.
4. Duechler, M., Ketter, S., Skern, T., Kuechler, E., Blaas, D. (1993). Rhinoviral receptor discrimination: mutational changes in the *canyon* regions of human *Rhinovirus* types 2 and 14 indicate a different site of interaction, *Journal of General Virology*, 74, pp. 2287-2291.
5. Harvala, H, Robertson, I., McWilliam Leitch, E.C. *et al* (2008). Epidemiology and Clinical Associations of Human Parechovirus Respiratory Infections, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), pp 3446-3453.
6. Hoffmann, M., Hurlebaus, J., Weilke, C. (2007) Novel Methods for High-Performance *Melting* Curve Analysis Using the LightCycler® 480 System, Roche Applied Science, Biochemica (1).
7. Hyypiä, T., Puhakka, T., Ruuskanen, O., Mäkelä, M., Arola, A., Arstila, P. (1998), Molecular Diagnosis of Human *Rhinovirus* Infections: Comparison with Virus Isolation, *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), pp. 2081-2083.
8. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. *et al*. (1990). *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, Inc.
9. Lewis-Rogers, N., Bendall, M. L., Crandall, K. A. (2009). Phylogenetic Relationships and Molecular Adaptation Dynamics of Human *Rhinoviruses*, *Molecular Biology and Evolution*, 26(5), pp. 969-981.
10. Loens, K., Goossens, H., Laet, C. *et al* (2006) Detection of *Rhinoviruses* by Tissue Culture and Two Independent Amplification Techniques, Nucleid Acid Sequence- Based Amplification and Reverse Transcription-PCR, in children with Acute Respiratory Infections during a Winter Season, *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1), pp. 166-171.

11. Men, A. E., Wilson, P., Siemering, K., Forrest, S (2008). Sanger DNA Sequencing, Next-Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine.
12. Mewer, S., Wittwer, C., Nakagawara Kan-ichi (2004). *Rapid Cycle Real-Time-PCR: Methods and Applications*. New York: Springer Werlag.
13. Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L. (2007). Manual of Clinical Microbiology – volume 2, 9th edition, *ASM Press*.
14. NORMAN HO, PRASANNA RK, MARCOS AO, *et al* (1993). Structure of *Rhinovirus* complexed with its receptor molecule, *Biochemistry*, 90, pp.507-511.
15. Osion, N. H., Kolatkar, P. R., Oliverira, M. A., *et al* (1993). Structure of a human *Rhinovirus* complexed with its receptor molecule. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90, pp. 507-511.
16. Palmenberg, A. C., Spiro, D., Kuzmickas, R., *et al* (2009). Sequencing and Analyses of All Known Human *Rhinovirus* Genomes Reveal Structure and Evolution, *SCIENCE*, 324.
17. Peltola, V. *et al.* (2008a). *Rhinovirus* Transmission within Families with Children: Incidence of Symptomatic and Asymptomatic Infections, *The Journal of Infectious Diseases*, 197(3), pp. 382-9.
18. Peltola, V. *et al.* (2008b). Clinical Effects of *Rhinovirus* Infections, *Journal of Clinical Virology*, 43 (4), pp. 411-414
19. Reichl, U., Wittwer, C., Cockerill, F. (2002). *Rapid Cycle Real-Time-PCR: Methods and Applications - Microbiology and Food Analysis*. New York: Springer Werlag.
20. Roche Molecular Systems (2003). The Evolution of PCR. *Roche Molecular Systems*, Inc.
21. ROCHE Molecular Systems (2003). *The Evolution of PCR*. Roche Molecular Systems, Inc.
22. Semler, BL and Wimmer, E (2004): Molecular Biology of Picornaviruses.

23. Smith, T. J., Osion, N. H., Cheng, R. H. *et al* (1993). Structure of Human *Rhinovirus* Complexed with Fab Fragments from a Neutralizing Antibody, *Journal of Virology*, 67(3), pp. 1148-1158.
24. Spyridaki, I. S., Christodoulou, I., Beer, L. *et al* (2009). Comparison of four nasal sampling methods for detection of viral pathogens by RT-PCR-A GA²LEN project, *Journal of Clinical Microbiology*, 156, pp. 102-106.
25. Tapparel, C., Cordey, S., Belle, S. V. *et al* (2009). New Molecular Detection Tools Adapted to Emerging *Rhinoviruses* and *Enteroviruses*, *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), pp. 1742-1749.
26. Todd, S., Semler, B. L. (1996). Structure-infectivity analysis of the human *Rhinovirus* genomic RNA 3' non-coding region. *Nucleic Acid Research*, 24(11), pp. 2133-2142.
27. Wisdom, A., Kutkowska, A. E., Leitch, E. C. M. (2009). Genetics, Recombinations and Clinical Features of Human *Rhinovirus* Species C (HRV-C) Infections; Interactions of HRV-C with Other Respiratory Viruses. *PLoS One*, 4.
28. Wisdom, A., Leitch, E. C. M., Gaunt, E., Harvala, H., Simmonds, P. (2009). Screening Respiratory for Detection of Human *Rhinoviruses* (HRVs) and *Enteroviruses*: Comprehensive VP4-VP2 Typing Reveals High Incidence and Genetic Diversity of HRV Species C, *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), pp. 3958-3967.
29. Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., Pryor, R. J. (2003). High-Resolution Genotyping by Amplicon *Melting* Analysis LCGreen. *Clinical Chemistry*, 49 (6), pp. 853-860.

Parte V

Anexos



Consentimento Informado

Para participação voluntária no projecto “Estudo Molecular da Epidemiologia da Infecção por *Rhinovirus* na região do Grande Porto”


O Projecto acima designado, visa estudar mensalmente e pontualmente amostras nasais de indivíduos da região do Grande Porto com ou sem sintomatologia de infecção respiratória superior. Nestas amostras nasais será pesquisada a presença de agentes patogénicos (micróbios) que causam infecções respiratórias ligeiras (conhecidas como constipações). A cada pessoa será também solicitada a recolha de uma amostra de sangue para estudo de variações genéticas que possam explicar a maior ou menor tendência individual para ficar doente quando exposto a estes agentes patogénicos.

Eu abaixo-assinado, declaro que concordei voluntariamente em participar no estudo acima resumido e que autorizo a utilização das minhas amostras para os fins descritos. Entendo que em nenhuma situação, a participação no estudo será objecto de qualquer pagamento ou retribuição financeira ou outra, e que os resultados do estudo não constituem por si qualquer benefício pessoal para os participantes. Entendo e aceito que posso em qualquer momento desistir da minha participação no estudo, ainda que as amostras que até essa data tiver concordado em fornecer poderão continuar a ser parte integrante do mesmo. Entendo também, e aceito, que os responsáveis pelo projecto poderão em qualquer momento desistir da minha participação no projecto, por razões de ordem científica, logística, financeira ou outra, sem que tal constitua razão para me sentir lesado.

Os responsáveis do projecto assumem sob compromisso de honra, manter sob estrito sigilo todas as informações de ordem pessoal, nomeadamente as que permitam identificar o voluntário, cruzar a identificação do voluntário com a da identificação da amostra, bem como com os resultados obtidos tanto para as amostras nasais como para a amostra sanguínea.

O Voluntário

O Responsável pelo projecto

	<h2>Questionário/Inquérito</h2> <p>O presente questionário destina-se a recolha dos dados sintomatológicos no âmbito do Projecto de Investigação "Estudo Molecular da Epidemiologia da Infecção por <i>Rhinovirus</i> na região do Grande Porto". Antecipadamente agradecemos o tempo que dedicou a este estudo.</p>																																	
<p>Identificação da Amostra:</p> <p>1. Nome: _____</p> <p>2. Data da colheita: ___/___/___ Hora da colheita: ___/___/___</p>																																		
<p>Caracterização Geral:</p> <p>(Preencher apenas se este for o seu primeiro inquérito)</p> <p>3. Idade: _____anos</p> <p>4. Profissão: _____</p> <p>5. Sexo: Masculino <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/></p> <p>6. Tem manifestações de alergia/hipersensibilidade:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;">Asma brônquica</td> <td style="width: 30%;">Sim... <input type="checkbox"/></td> <td style="width: 30%;">Não.... <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Alergia medicamentosa</td> <td>Sim... <input type="checkbox"/></td> <td>Não.... <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Alergia de contacto/pele</td> <td>Sim... <input type="checkbox"/></td> <td>Não.... <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Alergia Alimentar</td> <td>Sim... <input type="checkbox"/></td> <td>Não.... <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Alergia picada Insectos</td> <td>Sim... <input type="checkbox"/></td> <td>Não.... <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Outra</td> <td>..... <input type="checkbox"/></td> <td>Qual? _____</td> </tr> </table>		Asma brônquica	Sim... <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>	Alergia medicamentosa	Sim... <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>	Alergia de contacto/pele	Sim... <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>	Alergia Alimentar	Sim... <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>	Alergia picada Insectos	Sim... <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>	Outra <input type="checkbox"/>	Qual? _____															
Asma brônquica	Sim... <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>																																
Alergia medicamentosa	Sim... <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>																																
Alergia de contacto/pele	Sim... <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>																																
Alergia Alimentar	Sim... <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>																																
Alergia picada Insectos	Sim... <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>																																
Outra <input type="checkbox"/>	Qual? _____																																
<p>Sintomas nos últimos 30 dias:</p> <p>7. Durante os últimos 30 dias alguma vez teve:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;">Espirros em série/frequentes</td> <td style="width: 30%;">Sim.. <input type="checkbox"/></td> <td style="width: 30%;">Não <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Nariz a pingar</td> <td>Sim.. <input type="checkbox"/></td> <td>Não.... <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Nariz entupido</td> <td>Sim.. <input type="checkbox"/></td> <td>Não.... <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Dores de cabeça</td> <td>Sim.. <input type="checkbox"/></td> <td>Não.... <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Lacrimação e prurido</td> <td>Sim.. <input type="checkbox"/></td> <td>Não.... <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Perda do olfacto e sabor</td> <td>Sim.. <input type="checkbox"/></td> <td>Não.... <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Comichão intensa no nariz</td> <td>Sim.. <input type="checkbox"/></td> <td>Não.... <input type="checkbox"/></td> </tr> </table> <p>8. Durante os últimos 30 dias, os problemas de nariz foram acompanhados de estados lacrimais ou de "comichão" nos olhos? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/></p> <p>9. Durante os últimos 30 dias que factores pensa que lhe provocaram os problemas nasais?</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 80%;">Pó da casa</td> <td style="width: 20%;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Pólen de árvores e/ou plantas</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Animais Domésticos</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Produtos Irritativos (Químicos)</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Constipação</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Factores não identificados</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		Espirros em série/frequentes	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	Nariz a pingar	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>	Nariz entupido	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>	Dores de cabeça	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>	Lacrimação e prurido	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>	Perda do olfacto e sabor	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>	Comichão intensa no nariz	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>	Pó da casa	<input type="checkbox"/>	Pólen de árvores e/ou plantas	<input type="checkbox"/>	Animais Domésticos	<input type="checkbox"/>	Produtos Irritativos (Químicos)	<input type="checkbox"/>	Constipação	<input type="checkbox"/>	Factores não identificados	<input type="checkbox"/>
Espirros em série/frequentes	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>																																
Nariz a pingar	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>																																
Nariz entupido	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>																																
Dores de cabeça	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>																																
Lacrimação e prurido	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>																																
Perda do olfacto e sabor	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>																																
Comichão intensa no nariz	Sim.. <input type="checkbox"/>	Não.... <input type="checkbox"/>																																
Pó da casa	<input type="checkbox"/>																																	
Pólen de árvores e/ou plantas	<input type="checkbox"/>																																	
Animais Domésticos	<input type="checkbox"/>																																	
Produtos Irritativos (Químicos)	<input type="checkbox"/>																																	
Constipação	<input type="checkbox"/>																																	
Factores não identificados	<input type="checkbox"/>																																	