

Caroline Measso do Bonfim

Prevalência de vírus respiratórios em crianças de creche com
sintomas de infecções respiratórias agudas

São José do Rio Preto

2010

CAROLINE MEASSO DO BONFIM

**Prevalência de vírus respiratórios em crianças de creche com
sintomas de infecções respiratórias agudas**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Microbiologia, área de Virologia junto
ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto

2010

Bonfim, Caroline Measso do.

Prevalência de vírus respiratório em crianças de creche com sintomas de infecções respiratórias agudas / Caroline Measso do Bonfim. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

86 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Fátima Pereira de Souza

Dissertação (mestrado) -Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Virologia. 2. Vírus respiratório. 3, Infecção por vírus - Epidemiologia. 4. Infecção respiratória aguda - Epidemiologia. 5. Crianças de creche. I. Souza, Fátima Pereira de. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 578

CAROLINE MEASSO DO BONFIM

**Prevalência de vírus respiratórios em crianças de creche com
sintomas de infecções respiratórias agudas**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Virologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Fátima Pereira de Souza
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Dr. José Luiz Proença Módena
Professor Doutor
USP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Prof^ª. Dr^ª. Maria Elisabete Jorge Amaral
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 05 de Abril de 2010

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Agradeço a Deus por guiar meu caminho todos os dias.

À UNESP-IBILCE pela oportunidade e aprendizado.

À Prof^a Dr^a Fátima Pereira de Souza pela orientação deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Paula Rahal pela disponibilização do laboratório onde foi realizado este trabalho.

À Prof. Dr. José Antônio Cordeiro pela colaboração.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos integrantes do LEGO: Lenira, Jucimara, Paola, Marília, Érica, Marina Lílían Pires, Carol Jardim, Cíntia, Paulo, Lílían (Miuki), Valéria, André, Natália, Ana Cláudia, Renata e Plínio, por toda ajuda, compreensão, apoio e amizade.

Às minhas amigas Maísa, Lilica, Suelen, Thaís, Aline, Priscila e Lí pelo companheirismo nas horas boas e ruins.

Ao meu namorado Hilário por ter me suportado, tentando sempre me acalmar nos momentos de dificuldades.

E agradeço também, é claro, ao meu pai, minha mãe, minhas irmãs e minha avó por ter me incentivado e ter me dado carinho sempre. Agradeço a Deus pela família perfeita que somos. Amo muito.

RESUMO

Resumo

RESUMO

As infecções do trato respiratório estão associadas com mortalidade significativa no mundo inteiro e afetam principalmente crianças menores de cinco anos de idade. A maioria das infecções respiratórias é causada por agentes virais como: *Vírus Sincicial Respiratório* (RSV), *Influenzavírus* tipo A e B (FLUA e FLUB), *Parainfluenza* tipo 1, 2 and 3 (PIV-1, PIV-2 e PIV-3), *Rhinovírus* (HRV) e *Metapneumovirus Humano* (hMPV). O conhecimento da epidemiologia e prevalência desses vírus é importante para que metodologias terapêuticas possam ser aplicadas apropriadamente e saber como esses vírus estão circulando. O objetivo deste trabalho foi investigar a incidência de 8 tipos de vírus respiratórios em 279 amostras de aspirado nasofaríngeo obtidas de Julho/2004 a Setembro de 2005 de 120 crianças (73 do sexo masculino e 47 do sexo feminino) com idade entre 0 a 6 anos com sintomas de infecção respiratória aguda. A análise foi realizada pela técnica de RT-PCR e sequenciamento direto. Nossos resultados mostraram que 27,2% (76/279) das amostras foram positivas para pelo um dos vírus respiratórios, sendo 84,2% (64/76) de Picornavírus, 76,3% (58/76) de *Rhinovírus* e 7,9% de *Enterovírus* (6/76), 7,9% (6/76) de RSV, 1,3% (1/76) de hMPV, 2,6% (2/76) de FLUA, 2,6% (2/76) de PIV-1 e 1,3% (1/76) de PIV-2. As infecções repetidas acometeram 29% (22/76) das crianças com infecção respiratória. A maioria das re-infecções, 82% (18/22), foram pelo gênero *Rhinovírus*. Os sintomas mais frequentes foram coriza diagnosticada em 89,5% dos casos (68/76) seguido de tosse em 67,1% (51/76). Os *Rhinovírus* foram detectados em todo o período de estudo, com picos de infecção nos meses de inverno e outono, porém não houve associação significativa entre a presença viral e a sazonalidade. Neste estudo houve prevalência de infecção e re-infecção por *Rhinovírus*. Portanto, este estudo proporcionou melhor entendimento da circulação de vírus respiratórios em população de creche na região de São José do Rio Preto, o que permitirá planejamentos futuros de recursos necessários para o desenvolvimento de programas de prevenção.

Palavras-chave: Infecção respiratória aguda, vírus respiratórios, crianças de creche, *Rhinovírus*, sazonalidade.

ABSTRACT

Abstract

ABSTRACT

Respiratory tract infections are associated with significant mortality worldwide and affect mostly children under five years of age. Most respiratory infections are caused by viral agents such as: *Respiratory Syncytial Virus* (RSV), the viruses of *Influenza* type A and B (FLUA and FLUB), *Parainfluenza* type 1, 2 and 3 (PIV-1, PIV-2 and PIV-3), *Rhinovirus* (HRV) and *Human Metapneumovirus* (hMPV). Knowledge of the epidemiology and prevalence of these viruses is important for therapeutic methods can be applied as appropriate and to know how these viruses are circulating. The aim of this work was to investigate the incidence of 8 types of respiratory viruses in 279 samples of nasopharyngeal aspirated obtained from July/2004 to September/2005 of 120 children (73 male and 47 female) with age between 0 to 6 years with symptoms of acute respiratory infection. The analysis was performed by RT-PCR and direct sequencing. Our results showed that 27,2% (76/279) of samples were positive at least for a type of the respiratory viruses, with 84,2% (64/76) of *Picornaviruses*, with 76,3% (58/76) of *Rhinovirus* e 7,9% of *Enterovirus* (6/76), 7,9% (6/76) of RSV, 1,3% (1/76) of hMPV, 2,6% (2/76) of FLUA, 2,6% (2/76) of PIV-1 and 1,3% (1/76) of PIV-2. The recurrent infections affect 29% (22/76) of children with respiratory infection. Most re-infections, 82% (18/22), were by *Rhinovirus* genus. The most frequent symptoms were runny nose diagnosed in 89.5% (68/76) followed by cough in 67.1% (51/76). *Rhinovirus* were detected throughout the study period, with peaks of infection during the winter and autumn, but there was no significant association between viral presence and seasonality. In this study there was prevalence of infection and re-infection by *Rhinovirus*. Therefore, this study provided better understanding of the circulation of respiratory viruses in a population of day care in the region of São José do Rio Preto, which will allow future planning of resources needed for the development of prevention programs.

Key words: Acute respiratory infection, respiratory virus, daycare children, *Rhinovirus*, seasonality.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Caracterização e Morfologia dos vírus.....	2
1.1.1 Família <i>Paramyxoviridae</i>	2
1.1.2 Família <i>Orthomyxoviridae</i>	5
1.1.3 Família <i>Picornaviridae</i>	7
1.2 Epidemiologia e Sazonalidade.....	9
1.3 Fatores de Risco e Transmissão.....	13
1.4 Sintomatologia.....	15
1.5 Diagnóstico, Tratamento e Prevenção.....	17
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Casuística.....	24
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	24
3.3 Aprovação Institucional e Questionários.....	25
3.4 Colheita e processamento das amostras de secreção nasofaringe.....	25
3.5 Extração de RNA.....	26
3.6 Transcrição Reversa (RT-PCR).....	27
3.7 Amplificação.....	27
3.8 Tipagem dos <i>Picornavírus</i> para detecção de <i>Rhinovírus</i> ou <i>Enterovírus</i> por de seqüenciamento direto.....	29
3.8.1 Purificação dos <i>amplicons</i>	30
3.8.2 Reação de Marcação Fluorescente com <i>BigDye® Terminator v3.1</i> <i>Cycle Sequencing Kit</i>	31
3.8.3 Precipitação.....	31
3.8.4 Sequenciamento.....	32
3.9 Tipagem.....	32
3.10 Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	36
4.1 Características da população de estudo.....	36
4.2 Sintomas diagnosticados.....	42

4.3 Sazonalidade dos vírus respiratórios estudados.....	46
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÕES.....	63
Referências Bibliográficas.....	66
Anexos.....	79
Anexo I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	80
Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	81
Anexo III – Quadro geral do paciente.....	82
Anexo IV – Quadro atual do paciente.....	84

LISTAS DE FIGURAS

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática de um <i>Pneumovírus</i>	3
Figura 2: Representação esquemática da organização genômica do RNA do RSV.....	4
Figura 3: Representação esquemática da organização genômica do RNA do PIV-1....	5
Figura 4: Representação esquemática da estrutura do <i>Vírus Influenza A</i>	6
Figura 5: Representação esquemática de um <i>Influenzavírus</i>	7
Figura 6: Representação esquemática da estrutura do capsídeo dos <i>Picornavírus</i>	8
Figura 7: Representação esquemática do genoma dos <i>Picornavírus</i>	9
Figura 8: Eletroferograma de uma sequência do genoma de <i>Rhinovírus</i>	33
Figura 9: Resultados da PCR em Gel de Agarose.....	37
Figura 10: Positividade dos vírus respiratório de amostras de aspirados da nasofaringe	38
Figura 11: Relação da positividade total das amostras com a faixa etária das crianças infectadas com vírus respiratórios.....	40
Figura 12: Relação de cada vírus respiratório com a distribuição etária das crianças.....	41
Figura 13: Gráfico ilustrando a renda familiar das crianças com infecções respiratórias.....	42
Figura 14: Número total de infecções repetidas e infecções repetidas por <i>Rhinovírus</i>	46

Figura 15: Distribuição sazonal de infecções respiratórias virais em crianças de creche no período de junho de 2004 a setembro de 2005.....	47
Figura 16: Distribuição mensal das amostras positivas de <i>Rhinovírus</i> durante os meses de Junho de 2004 a Setembro de 2005.....	48
Figura 17: Distribuição sazonal das amostras positivas de <i>Rhinovirus</i>	49

ABREVIACÕES

Abreviações

RSV: Vírus Sincicial Respiratório
hMPV: Metapneumovírus Humano
FLU: Vírus Influenza
FLUA: Vírus Influenza A
FLUB: Vírus Influenza B
HRV: Rhinovírus Humano
Pic: Picornavírus
HEV: Enterovírus Humano
PIV: Vírus Parainfluenza
PVI-1: Vírus Parainfluenza Tipo 1
PIV-2: Vírus Parainfluenza Tipo 2
PIV-3: Vírus Parainfluenza Tipo 3
N: Proteína do nucleocapsídeo
P: Fosfoproteína
L: Subunidade grande da Polimerase
F: Proteína de Fusão
G: Proteína de Ligação
SH: Proteína Hidrofóbica
NS1: Proteína Não-Estrutural 1
NS2: Proteína Não-Estrutural 2
M: Proteína de Matriz Interna
M2-1: Proteína de Matriz
M2-2: Proteína de Matriz
H/N: Hemaglutinina/Neuraminidase
APVC: Pneumovirus Aviário Do Tipo C
NP: Nucleoproteína
HA: Hemaglutinina
NA: Neuraminidase
P/C: Proteína associada ao nucleocapsídeo viral
VP1: Proteína do capsídeo viral
VP4: Proteína do capsídeo viral

Vpg: Virion Protein Genome Linked (Proteína do vírion ligada ao genoma)
IRES: Internal Ribosome Entry Site (Sítio interno de entrada do ribossomo)
IRA: Infecção Respiratória Aguda
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)
RT-PCR: Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase
IFI: Imunofluorescência Indireta
PBS: Phosphate Buffered Saline
dNTP: Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
5'UTR: Região não traduzida (Untranslated Region)

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias têm um significativo impacto na área da saúde no mundo inteiro, sendo predominantemente de origem viral. Essas infecções do trato respiratório constituem a principal causa de consultas aos serviços de saúde e perda de dias do trabalho e da escola nos EUA (HUESTON, 1999). No Brasil, essas infecções apresentam morbidade e mortalidade significativa e conseqüentemente alta demanda por serviços de saúde nas mais diversas instâncias de assistência (VASQUEZ & MOSQUERA, 1999).

Os principais vírus que primariamente infectam o trato respiratório são: *Influenza do tipo A e B* (FLUA e FLUB), *Parainfluenza* do tipo 1, 2, e 3 (PIV-1, 2 e 3), *Vírus Sincicial Respiratório* (RSV), *Rhinovírus Humano* (HRV), *Metapneumovírus Humano* (hMPV), *Adenovírus* (HAdV) e *Bocavírus Humano* (HBoV) (CHERRY, 2004; FOUCHIER et al., 2005; FOULONGNE et al., 2006)

1.1 - Caracterização e Morfologia dos vírus

1.1.1 Família *Paramyxoviridae*

Esta família de vírus inclui alguns dos mais bem sucedidos patógenos que causam epidemias de importância médica, dentre eles: o *Vírus Sincicial Respiratório* (RSV), *Metapneumovírus Humano* (hMPV) e *Parainfluenza Vírus* (PIV).

Possuem genoma de fita simples de RNA (ácido ribonucléico), sense negativa, não-segmentada. Esses vírus carregam em suas partículas virais uma enzima denominada RNA polimerase, pois o RNA viral que entra na célula, não pode ser tradu-

zido nem copiado pela maquinaria celular. A RNA polimerase do vírus transcreve o genoma de polaridade negativa.

O *Vírus Sincicial Respiratório* pertence ao gênero *Pneumovirus* e apresenta tamanho médio de 120 a 300nm, simetria helicoidal e morfologia esférica, contendo um envelope composto de uma bicamada derivada de membrana plasmática, como pode ser visto na Figura 1. O RSV apresenta dois subtipos, A e B, que são distinguidos pelas diferenças na proteína de ligação (G) ou na proteína nuclear (N) (PERET et al., 1998).

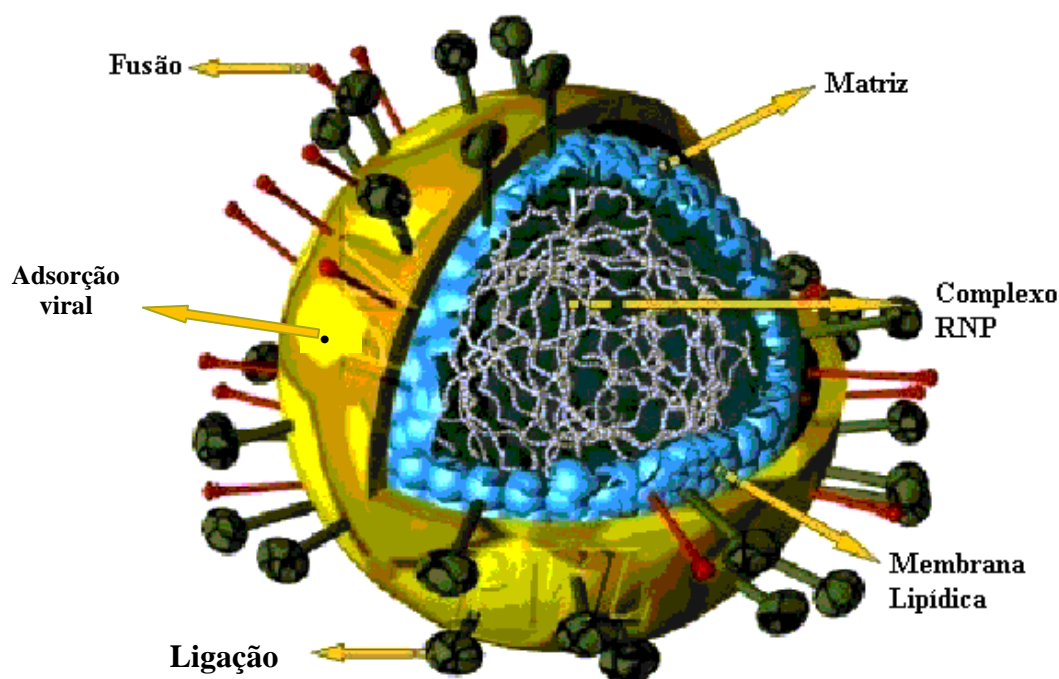


Figura 1 – Representação esquemática de um *Pneumovírus*. Destacam-se no esquema a bicamada lipídica, o complexo ribonucleoprotéico (RNP) e as proteínas de ligação G, de fusão F e de matriz M, (Fonte: <http://template.bio.warwick.ac.uk/staff/easton/IMAGES/Diagrams/3dvirus.jpg>).

O genoma do RSV codifica 10 RNAs mensageiros (mRNA), os quais são traduzidos em 11 proteínas: quatro proteínas do nucleocapsídeo – proteína do nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), subunidade grande da polimerase (L), fator de

elongação da transcrição (M2-1); três glicoproteínas transmembrânicas – proteínas de fusão (F), proteína de ligação (G) e uma pequena proteína hidrofóbica (SH); duas proteínas não estruturais NS1 e NS2; uma proteína de matriz (M); e um fator de regulação de RNA (M2-2), observado na figura 2 (OGRA, 2004).

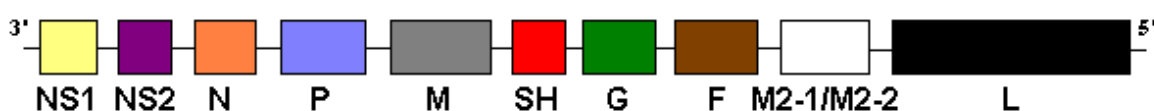


Figura 2 – Representação esquemática da organização genômica do RNA do RSV, evidenciando-se as regiões gênicas de todas as proteínas virais. NS1 e NS2: regiões gênicas de proteínas não estruturais; N, P e L: regiões gênicas de proteínas associadas ao nucleocapsídeo viral; M, M2.1 e M2.2: regiões gênicas de proteínas de matriz; F, G e SH: regiões gênicas das proteínas transmembrânicas de superfície responsáveis pela fusão, ligação e adsorção viral à célula hospedeira (baseado em Ogra, 2004).

O *Metapneumovírus Humano* é membro da subfamília *Pneumovirinae*, sendo o primeiro patógeno humano do gênero *Metapneumovirus*. Essa subfamília inclui também o RSV, que compartilha muitas características clínicas e epidemiológicas com o hMPV.

A alta heterogeneidade dentro desse genoma pode causar uma imunidade incompleta e infecções recorrentes são comuns com esse vírus (BOIVIN et al., 2002 ; CHAN et al., 2003). Estudos de soro prevalência têm mostrado que o hMPV circula entre a população humana por volta de 50 anos e virtualmente todas as crianças com mais de 5 anos mostram evidência sorológica de infecção passada (FALSEY et al., 2003).

As análises das sequências identificaram 2 genótipos principais do hMPV, A e B, com subtipos A1, A2, B1 e B2 (ISHIGURO et al., 2004) e uma alta identidade com a

sequência do *Pneumovírus Aviário* do sorotipo C (APVC), que é agente etiológico de doenças respiratórias em aves (HOOGEN et al., 2002).

O mapa genético dos PIV é similar ao do RSV e, codifica três proteínas associadas ao genoma incluindo a proteína do nucleocapsídeo (N), a fosfoproteína (P) e a subunidade grande da polimerase (L); três proteínas associadas ao envelope, incluindo a proteína de matriz interna (M), as glicoproteínas transmembrânicas de superfície de fusão (F) e hemaglutinina-neuraminidase (HN), como pode ser visto na figura 3 (NEWMAN et al., 2002). Além destas, são codificadas proteínas acessórias que diferem entre os diferentes sorotipos do *Parainfluenza Vírus*, que são PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4a e PIV-L4b (MAKIE, 2003).

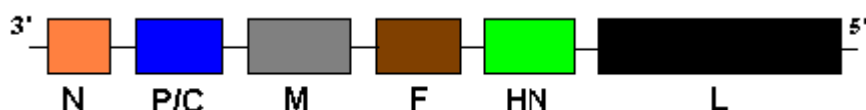


Figura 3 – Representação esquemática da organização genômica do RNA do PIV-1, evidenciando-se as regiões gênicas de todas as proteínas virais. N, P/C e L: regiões gênicas de proteínas associadas ao nucleocapsídeo viral; M, F e HN: regiões gênicas das proteínas associadas ao envelope, responsáveis pela fusão, ligação e adsorção viral à célula hospedeira (baseado em Newman et al., 2002).

1.1.2 Família *Orthomyxoviridae*

Esta família inclui três gêneros: *Influenzavírus* A, B e C. São vírus envelopados, de RNA de fita simples sense negativa, circundado por um capsídeo helicoidal e contendo 8 segmentos de RNA, os quais codificam 10 proteínas, como evidencia a figura 4 (NELSON & HOLMES, 2007).

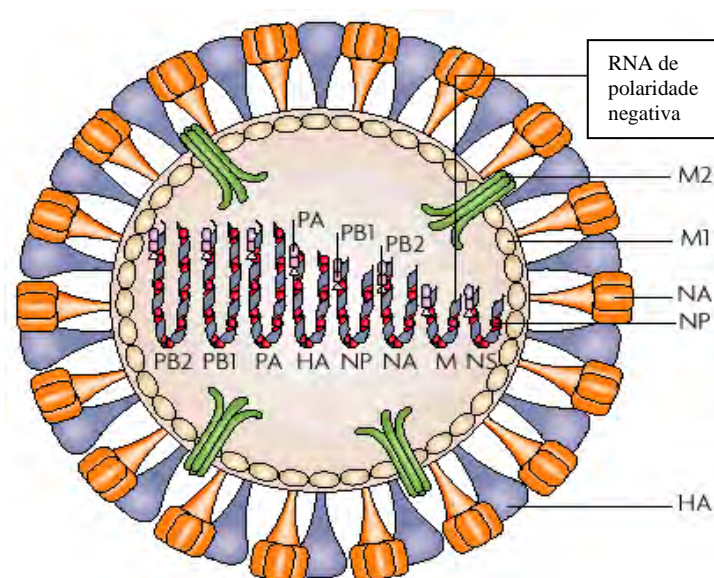


Figura 4 – Representação esquemática da estrutura do *Vírus Influenza A*, mostrando a disposição das proteínas virais e RNA fragmentado em oito segmentos, na partícula viral (Fonte: Nelson & Holmes, 2007).

Os vírus *Influenza A* e *B* são morfologicamente muito semelhantes. Podem ser partículas esféricas de 80 a 120 nm de diâmetro ou filamentosas. O RNA é protegido por uma nucleoproteína (NP). Esta proteína é um antígeno tipo-específico e é antigenicamente distinto entre os três gêneros, o que promove a base para a classificação do *Influenzavírus A*, *B* e *C*. (MAKIE, 2003; GE et al., 2004). A característica mais marcante da estrutura destes vírus são as projeções radiais de espículas, que se observam em toda a sua superfície. Estas espículas correspondem as glicoproteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) e podem ser observadas na figura 5.

Três segmentos do RNA genômico codificam os três componentes do complexo RNA transcriptase RNA-dependente: PA, PB1 e PB2.

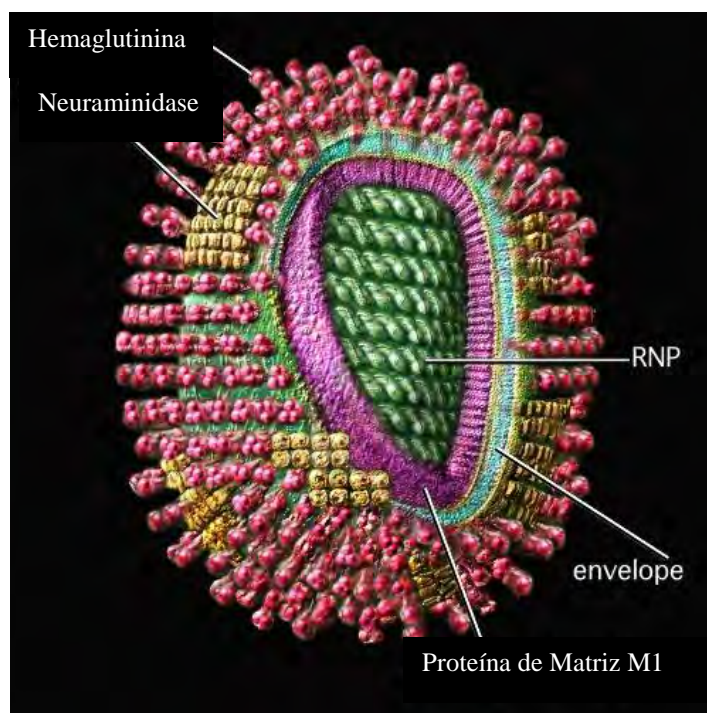


Figura 5 – Representação esquemática de um *Influenzavírus*, evidenciando a simetria helicoidal do nucleocapsídeo viral, disposição das proteínas de matriz e glicoproteínas de superfície (Fonte: <http://www.rkm.com.au/VÍRUS/Influenza/FLU-images/VÍRUS-FLU-structure-L-500.jpg>)

1.1.3 Família *Picornaviridae*

A família dos Picornavírus é um grupo de diversos patógenos humanos, incluindo os *Enterovírus Humano* (HEV) e os *Rhinovírus Humano* (HRV) que juntos constituem a causa mais comum de infecções virais em humanos no mundo (MAKIE, 2003). O *Rhinovírus* é o responsável por cerca de 60% dos resfriados comuns e apresenta três espécies: HRV-A, HRV-B e mais recentemente o HRV-C. Vírus pertencentes à espécie do *Rhinovírus Humano C* são distintos dos HRV-A e HRV-B. Estes vírus tem sido chamados de HRV-A2 (ARDEN et al., 2006; MCERLEAN et al., 2007) devido a sua estreita relação com HRV-A em algumas análises, enquanto outros autores tem chamado de HRV-C (LAMSON et al., 2006; LAU et al., 2007; LEE et al.,

2007; MCERLEAN *et al.*, 2008) ou HRV-X (KISTLER *et al.*, 2007). Os *Enterovírus* são detectados com menos frequência (<http://www.asma-bronquica.com.br/>).

A família *Picornaviridae* recebe este nome devido ao seu ínfimo tamanho (aproximadamente 15-30 nm de diâmetro). O seu genoma é constituído de RNA de fita simples e apresenta simetria icosaédrica (poliedro com 20 lados, mostrado na figura 6 de DRESCHERS *et al.*, 2007) e orientações positivas, sendo composto por 30% de RNA e 70% de proteína. O vírion consiste em um capsídeo de 60 subunidades, cada qual com quatro proteínas (VP1 a VP4). Este vírus possui mais de 100 sorotipos diferentes, os quais apresentam pequenas diferenças na sequência genética e estrutura antigênica.

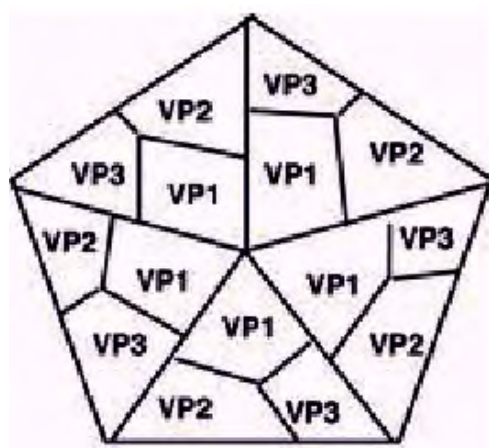


Figura 6 – Representação esquemática da estrutura do capsídeo dos *Picornavírus*, mostrando a disposição dos protômeros VP1, VP2 e VP3 (Fonte: Dreschers *et al.*, 2007).

A organização genômica é similar em todos os gêneros de picornavírus. Uma proteína denominada Vpg é unida à extremidade 5' do RNA, o que é um pré-requisito para a síntese de fitas de RNA negativo como molde para replicação. A extremidade 5'

também contém a sequência do sítio interno de entrada ribossomal (IRES) e permite a ligação às subunidades ribossomais da maquinaria de tradução do hospedeiro. Seguindo a IRES, localiza-se a unidade P1, que contém informação para a formação do capsídeo, e depois unidades que codificam proteínas não estruturais (proteases e RNA-polimerase dependente de RNA) denominadas P2/P3. O genoma é completado por uma região não-traduzida e uma cauda poli A na extremidade 3' (Figura 7) (DRESCHERS et al., 2007).

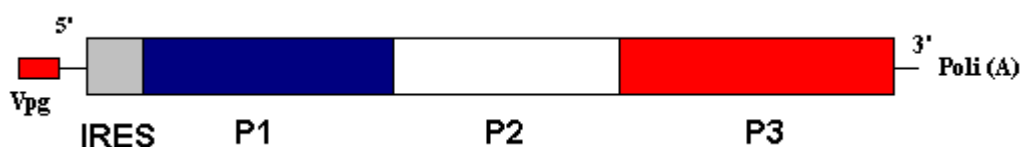


Figura 7 – Representação esquemática do genoma dos *Picornavírus*, demonstrando a disposição do IRES, que permite a ligação do material genômico à subunidades ribossomais da maquinaria de tradução do hospedeiro. Evidencia as unidades da poliproteína inicial P1, que contém informações para a formação do capsídeo, P2 e P3 que codificam proteínas não estruturais. (baseada em DRESCHER et al., 2007).

1.2- Epidemiologia e Sazonalidade

As infecções respiratórias agudas (IRAs) são as maiores causas de morbidade e mortalidade por todo o mundo particularmente nos países em desenvolvimento (SELWYN, 1990). Essas infecções são as principais responsáveis por patologias do trato respiratório, acometendo indivíduos de todas as idades, especialmente crianças e pessoas imunocomprometidas (KESSON, 2007).

Ainda que a morbidade relacionada a estas infecções tenha sido descrita inicialmente em crianças, quadros graves em idosos e em portadores de doenças crônicas têm sido registrados (YANG & RUBIN, 1995; NICHOLSON et al., 1997; FALSEY et al., 2005).

Algumas características do hospedeiro, como idade, têm sido mostradas relevantes para o aumento na incidência e ou gravidade das infecções respiratórias causadas por vírus tanto em crianças como em pessoas idosas (ZAMORANO et al., 2003). Em indivíduos idosos ou em pacientes imunocomprometidos, há também significativa relevância na ocorrência de pneumonia (FALSEY et al., 2006). Há um predomínio de crianças do sexo masculino com infecções respiratórias virais. Essa preponderância do sexo masculino quanto à morbidade por doenças do trato respiratório é relatada na literatura (KOCH et al., 2003; IWANE et al., 2004). Fatores relacionados ao menor calibre da via aérea entre os meninos são os prováveis responsáveis por esse fenômeno (POST et al., 1992; IWANE et al., 2004).

Crianças na pré-escola e creches, devido ao contato com outras crianças diariamente, apresentam alta frequência de infecções respiratórias (QUACH et al., 2003) especialmente infecções ocasionadas por vírus *Influenza* (FLEMING & CROSS, 1993).

Entre os portadores de doenças crônicas, imunodeprimidos e idosos, a infecção respiratória viral e suas complicações têm se mostrado mais graves, o que reforça a necessidade de vigilância virológica, medidas profiláticas e, no caso do *Influenza*, indicação da vacina específica contra os sorotipos circulantes (CDC, 2004).

Vírus respiratórios ocasionam surtos e epidemias anuais em todos os continentes, com um padrão sazonal, na sua maioria, fortemente associado ao clima (SHEK & LEE, 2003).

Em países de clima temperado são mais incidentes durante o outono e inverno, entretanto em zonas tropicais são muito escassos os dados registrados na literatura

(OMER et al., 2008). Na região amazônica, por exemplo, existem relatos de que os surtos de infecções respiratórias possam ser associados à estação chuvosa, entretanto estudos de sazonalidade merecem ser implementados para um melhor controle epidemiológico dos diferentes agentes virais (<http://www.iec.pa.gov.br/pibic/res2006-25.htm>). O RSV exibe um padrão sazonal evidente em muitos países, com grande variação de uma região para outra. Estações do ano e o clima parecem influenciar a epidemiologia das infecções por este vírus (STENSBALLE et al., 2003).

Epidemias anuais de RSV ocorrem durante o inverno em climas temperados, enquanto dados epidemiológicos de regiões tropicais têm mostrado uma associação entre surtos de RSV e estações chuvosas (LOSCERTALES et al., 2002). Estudos de Thomazelli et al. (2007) realizados na cidade de São Paulo mostraram que as epidemias de RSV começam no final do outono ou começo do inverno, com picos em maio e duração de 5 meses.

Tem sido observado que o comportamento social humano pode aumentar o contato entre as pessoas e isto pode ter uma participação na sazonalidade das epidemias de RSV. Multidões, grandes famílias, múltiplos nascimentos e residências superpopuladas são conhecidos como fatores de risco de infecção por RSV (BULKOW et al., 2002).

O *Metapneumovírus Humano* também parece ter uma distribuição sazonal, com picos durante a estação mais fria do ano e primavera, similarmente aos vírus da *Influenza* e o RSV (HOOGEN et al., 2003; ESTRADA et al., 2007). O hPMV em países de clima temperado, geralmente apresenta uma distribuição sazonal que se sobrepõe à do RSV e FLU e com base nisto, postula-se que co-infecções entre o hMPV e outros ví-

rus respiratórios possam levar a um aumento da gravidade da doença (WOLF et al., 2006).

Já em regiões de clima subtropical, como Hong Kong, o pico da epidemia foi observado ocorrer durante os meses de primavera e início do verão, no mesmo período em que o RSV ocorre nesta região (PEIRIS et al., 2003).

No Brasil, a presença do vírus foi verificada no Estado do Sergipe, região nordeste do país, caracterizada pelo clima tropical durante todo o ano (CUEVAS et al., 2003). Porém, estudos distribuídos ao longo do ano ainda não foram realizados para esclarecer a época de maior transmissibilidade do vírus (MEJIAS et al., 2004).

Com o *Influenza*, a incidência da doença apresenta padrão sazonal em áreas de clima temperado, com picos bem demarcados durante o inverno. Alonso et al. (2007), fizeram uma análise quantitativa dos padrões sazonais de pneumonia e dados de mortalidade por Influenza nos estados brasileiros e revelaram nesse estudo que existe uma “onda” anual de Influenza viajando pelo sul do Brasil durante um período de aproximadamente 3 meses, começando em abril no norte de regiões equatoriais e atingindo regiões temperadas do sul em julho (ALONSO et al., 2007).

Entretanto, a razão para sazonalidade do *Influenza* ainda não é bem compreendida. Alguns autores sugerem que o clima pode ter uma influência direta na sobrevivência do vírus, na eficiência da transmissão, na susceptibilidade do hospedeiro, além de que o clima frio proporciona a aglomeração da população e maior disseminação viral (KAMPS et al., 2006; ALONSO et al., 2007).

Nos países de clima tropical, a epidemiologia do vírus *Influenza* é diferente, podendo ocorrer em qualquer época do ano, porém as epidemias apresentam tendência

de acontecer após mudanças nos padrões climáticos, como, por exemplo, relacionadas à estação de chuvas (KAMPS et al., 2006; ALONSO et al., 2007). No Brasil a epidemiologia do *Influenza* é atualmente bem conhecida nas regiões Sul e Sudeste onde a sazonalidade está bem caracterizada ocorrendo nos meses de outono e inverno (ALONSO et al., 2007).

O vírus *Parainfluenza* também apresenta uma ocorrência sazonal e é considerado um importante causador de doenças respiratórias, particularmente entre crianças menores de dois anos de idade (MONTTO, 2002). As epidemias de *Parainfluenza* do tipo 1 ocorre geralmente durante o outono em anos alternados, *Parainfluenza* do tipo 2 ocorre esporadicamente e *Parainfluenza* do tipo 3 tende a causar epidemias anuais no inverno em climas temperados (THOMAZELLI et al., 2007).

1.3 - Fatores de risco e Transmissão

Diversas características, tanto do vírus quanto do hospedeiro, são fatores que podem aumentar o risco das crianças contraírem infecções respiratórias graves. Dentre os fatores de risco relacionados ao hospedeiro estão: faixa etária, baixo peso ao nascer, não-aleitamento materno e desnutrição. Os fatores ambientais incluem a exposição passiva ao fumo, a aglomeração familiar, usuários de creche e a moradia em áreas urbanas com elevados índices de poluição atmosférica. São considerados fatores socioeconômicos: más condições de habitação e sanitárias, dificuldade de acesso ao serviço de saúde, cobertura vacinal insuficiente, baixa renda per capita e a baixa

escolaridade dos pais (FRANCA et al., 2001; NASCIMENTO-CARVALHO et al., 2002; MACEDO et al., 2007).

A escolaridade materna parece ter um papel importante na saúde da criança (CARDOZO et al., 2007). A maior escolaridade propiciaria um conjunto de ações relacionadas ao cuidado mais adequado da criança e ao conhecimento de medidas preventivas de saúde, as quais reduzem a morbidade por doença respiratória (PRIETSCHE et al., 2002).

A transmissão ocorre tanto pelo contato direto quanto por meio da secreção de indivíduos contaminados. Os vírus respiratórios são não-móveis, porém podem ser transmitidos através de partículas aéreas que são produzidas quando a pessoa infectada espirra ou tosse. Esta secreção é impulsionada a distâncias de aproximadamente 1 metro pelo ar, mas não permanecem suspensas no mesmo (BRANKSTON et al., 2007).

A infecção ocorre quando estas partículas são inaladas por outra pessoa e deposita-se nas mucosas nasal, faringiana ou do trato respiratório inferior. O contágio viral pode ocorrer por contato pessoa a pessoa através do toque interpessoal das superfícies das mãos que tiveram contato com secreções nasais infectadas, sendo que a maioria dos vírus respiratórios permanece viável nas superfícies por várias horas (http://www.asma-bronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_infeccao_viral.html).

Os vírus respiratórios são responsáveis também por infecções hospitalares em berçários e enfermarias pediátricas. A transmissão também ocorre através do contato direto com secreções de pessoas infectadas pelo ato da tosse, por secreções das narinas ou por objetos contaminados (BACHEGA et al., 1999).

1.4 - Sintomatologia

Nas infecções virais do trato respiratório, primeiramente observam-se sintomas de infecção das vias aéreas superiores apresentando sintomas como um simples resfriado caracterizado por febre, tosse e coriza, porém devido à afinidade viral por órgãos respiratórios inferiores, estas infecções evoluem para o trato respiratório inferior, apresentando quadros clínicos mais severos como bronquite, bronquiolite, broncopneumonia, insuficiência respiratória aguda e pneumonia (COELHO et al., 2007).

Em crianças menores de cinco anos de idade, e indivíduos idosos ou com doenças crônicas, a infecção respiratória pode induzir uma doença severa (PELTOLA & RUUSKANEN, 2008).

O vírus RSV é um dos patógenos mais comuns detectados em crianças que apresentam desde infecção leve até uma infecção mais severa do trato respiratório (DAMLE et al., 2008).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que o RSV representa a causa mais importante de doenças sérias do trato respiratório inferior, especialmente bronquiolite e pneumonia em crianças. RSV pode causar pneumonia severa e morte em pessoas com deficiência na imunidade (KESSON, 2007).

Crowcroft et al. (2007) realizaram, na Inglaterra, um estudo durante o período de 1 ano com crianças admitidas em um hospital pediátrico que apresentavam infecção por RSV e constataram a presença de tosse em 85% das crianças, coriza em 64% e 44% de cianose e febre. No Brasil, D'Elia et al. (2005) identificaram a presença 35,5% de ciano-

se, 5% de apnéia e 53,5% de febre em crianças hospitalizadas com infecção do trato respiratório inferior pelo *Vírus Sincicial Respiratório*.

As características clínicas do hMPV relembram as do RSV incluindo congestão nasal, mialgia, tosse e febre, e nos casos mais graves chiado, dificuldade na respiração, bronquiolite, pneumonia e falha respiratória. A co-infecção pelo RSV pode aumentar a gravidade da doença, e complicações como a asma pode aparecer (CROWE et al., 2004; WILLIAMS, 2005; MAZZONCINI et al., 2008).

Com o vírus *Influenza* os primeiros sintomas tais como a febre, calafrios, prostração, tosse, espirros, coriza, diarreia e vômitos, costumam aparecer cerca de 24 horas depois do contágio. No Paraná, estudos realizados por meio da técnica de imunofluorescência indireta, com pacientes pediátricos hospitalizados que mostraram manifestações clínicas de doenças respiratórias, apontaram o *Influenza* como o vírus responsável por complicações clínicas em 62.2% dos pacientes, como traqueobronquiolite aguda (37.1%) e broncopneumonia (34.3%). Em 26.6% dos pacientes ocorreu desenvolvimento de falhas respiratórias agudas (COELHO et al., 2007).

O vírus *Parainfluenza* 1-3 são as principais causas de tosse em crianças em fase de amamentação e menores de 5 anos de idade. *Parainfluenza* do tipo 3 também pode causar pneumonia viral e bronquiolite em crianças pequenas. Infecção primária com PIV proporciona um certo grau de imunidade, mas esta imunidade não é completa e re-infecções ocorrem frequentemente, mas raramente são tão graves como observada na infecção primária (KESSON, 2007).

Os *Rhinovírus*, membros da família *Picornaviridae*, são os principais agentes causadores do resfriado comum tanto em adultos como em crianças (BROWNLEE & TURNER, 2008). Este vírus foi previamente identificado em crianças com infecções do trato respiratório superior, porém, em um estudo realizado na França ele foi recentemente apontado como sendo o maior agente etiológico de bronquiolite e pneumonia na infância (JACQUES et al., 2006). Estudos têm mostrado que esse agente viral é o mais comum patógeno associado com exacerbação de asma em adultos e crianças (REGAMEY & KAISER, 2008).

Em um estudo realizado na Finlândia por Jartti et al. (2008) com 285 crianças que apresentavam maior risco de desenvolver asma, o *Rhinovírus* foi o vírus mais comumente detectado não somente no período de doenças, mas também durante visitas assintomáticas (foram detectados em 35% dos casos).

Além disso, novos subtipos de *Rhinovírus* têm sido recentemente identificados (LAMSON et al., 2006; MCERLEAN et al., 2008), evidenciando a diversidade desses vírus e a habilidade de escapar da resposta imune pré-existente.

Portanto, as altas taxas de infecções respiratórias causadas por *Rhinovírus* enfatizam a atenção que deve ser dispensada e a necessidade de mais estudos específicos para essas novas espécies de HRV.

1.5 – Diagnóstico, Tratamento e Prevenção

No diagnóstico dos vírus respiratórios pode-se adotar métodos diretos, como os que são capazes de recuperar o vírus mediante seu crescimento em cultivo celular e ainda aqueles que permitem detectar o vírus nas secreções respiratórias do paciente (de-

(detecção de antígenos e de ácidos nucleicos) (BELSHE et al., 1996).

A detecção de antígenos e ácidos nucleicos permite a realização de um diagnóstico rápido, que ajuda a tomar decisões terapêuticas. Por outro lado, o crescimento em cultivo celular é um diagnóstico lento e tardio, porém de extraordinária importância na caracterização epidemiológica, antigênica e filogenética destes vírus.

As técnicas de reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) e o ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) são considerados ferramentas importantes na detecção de vírus respiratórios, por apresentarem alta sensibilidade e especificidade e rapidez.

Com relação ao tratamento das infecções respiratórias causadas por vírus respiratórios, para o RSV, tem sido utilizado o Palivizumab que é um anticorpo monoclonal humano dirigido contra um local específico da superfície do RSV. Esse medicamento possui atividade neutralizante eficaz por inibir a fusão do RSV a membrana celular. Entretanto, a administração do Palivizumab, devido às suas reações adversas, é restrita a casos excepcionais com crianças acima de dois anos de idade (BONFANTI & ROYMANS, 2009).

A Ribavirina também tem sido utilizada como um tratamento antiviral específico em infecções por RSV (WALSH & GRAHAM, 1999). Porém, o tratamento com essa droga é questionado pela eficácia limitada e teratogenicidade da mesma. Além disso, o alto custo da Ribavirina compromete o uso pela população.

Para o hMPV, a Ribavirina tem mostrado atividade antiviral in vitro similar ao RSV (WYDE et al., 2003). O vírus atenuado também tem sido testado eficazmente

como vacina em modelos animais, mas nenhuma vacina foi usada em humanos (TANG *et al.*, 2003).

Outro vírus, o *Rhinovírus*, tem mais de 100 sorotipos, e o desenvolvimento de uma vacina não é considerado possível no momento. Um grande número de agentes experimentais foi testado para suas atividades anti-picornavírus, com resultados pouco animadores, porém alguns têm sido submetidos à fase inicial de testes clínicos (SMITH *et al.*, 1986; DE PALMA *et al.*, 2008).

O Pleconaril é um desses agentes mais estudados. Ele se liga à parte hidrofóbica do capsídeo viral VP1 inibindo, assim, a ligação, a entrada e o desnudamento do vírus (SMITH *et al.*, 1986). *In vitro*, a maioria dos HRV é inibida pelo Pleconaril, mas pelo menos sete sorotipos são resistentes a ele (LEDFORD *et al.*, 2004).

Somente o vírus *Influenza* é passível de tratamento preventivo, através de vacina que é considerada eficaz. Mas, apesar de existir uma vacina de prevenção contra esse vírus e muitas infecções causadas por ele poderem ser prevenidas com um programa de vacinação efetivo, uma pequena variação no antígeno pode fazer com que a vacina atual não seja mais eficaz, sendo assim necessária uma constante vigilância epidemiológica (COELHO *et al.*, 2007).

Portanto, não há terapêutica eficaz para os vírus respiratórios, mas algumas medidas como o encaminhamento de casos graves para seu tratamento adequado e oportuno, a prevenção desses casos graves, profilaxia, aumento do acesso e utilização do serviço de saúde pela população e atenção oportuna e adequada a todas as crianças menores de cinco anos podem ser fundamentais na busca do tratamento eficaz.

Atualmente, a única forma de prevenir infecções respiratórias virais é compreender a sua transmissão (PELTOLA et al., 2008; CROWCROFT et al., 2007), e tentar evitar a transmissão por meio de medidas de higiene. Isto tem sido demonstrado ser possível, em creches da Finlândia (UHARI et al., 1999).

Com base em todos os relatos referenciados acima, estudos que permitam aprimorar o conhecimento dos fatores clínicos e epidemiológicos das infecções respiratórias em crianças são essenciais e de grande relevância para a saúde pública.

Apesar da importância econômica e do impacto médico dos vírus respiratórios, poucos dados são fornecidos e maiores investigações são necessárias. Determinar a diversidade viral, suas funções e suas características devem ser de interesse da população para que medidas de controle e prevenção sejam implantadas e obtenham sucesso.

O presente estudo teve como meta avaliar os sintomas clínicos em crianças de creche e determinar a prevalência dessas infecções comparando com os diferentes tipos virais.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi detectar o genoma de vírus respiratórios em crianças de 0 à 6 anos de idade que freqüentavam a creche “Maria Inês Arnal”, em São José do Rio Preto e que apresentavam sintomas de infecção respiratória aguda.

Os objetivos específicos deste trabalho consistiram em:

1. Detectar e caracterizar, por meio da técnica de RT-PCR, porção do genoma de vírus respiratórios em amostras coletadas de crianças de 0 a 6 anos com infecção nas vias aéreas superiores (IVAS), procedentes da Creche Municipal Maria Inês Arnal na cidade de São José do Rio Preto.
2. Classificar em *Rhinovirus* ou *Enterovirus* as possíveis amostras que forem positivas para Família *Picornaviridae* por meio de sequenciamento direto.
3. Associar os dados clínicos e epidemiológicos da doença como: coriza, tosse, chiado, obstrução nasal, chiado recorrente, febre, idade da criança e sexo, com os vírus respiratórios identificados.
4. Associar os agentes virais detectados com a sazonalidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Casuística

O estudo foi realizado com amostras de aspirados nasofaríngeo obtidas de crianças de 0 a 6 anos com sintomas de infecções respiratórias agudas (espirros, coriza, febre, tosse e falta de ar) que freqüentavam a Creche Municipal “Maria Inês Arnal” em São José do Rio Preto no período de junho de 2004 a setembro de 2005.

Todas as 279 amostras clínicas que foram analisadas no presente trabalho encontravam-se armazenadas em Trizol-LS a temperatura de -80°C disponíveis no Banco de Amostras existente no laboratório onde os experimentos foram realizados.

3.2 – Critérios de inclusão e exclusão

Crianças que foram hospitalizadas devido à infecção respiratória foram excluídas do estudo, pois outro estudo do nosso grupo de pesquisa era responsável pelas amostras das crianças admitidas no hospital, enquanto que o presente estudo incluiu apenas amostras provenientes de crianças da creche com sintomas moderados de infecção respiratória.

No momento da colheita das amostras, para assegurar que o material genético encontrado fosse característico desta infecção respiratória e não de infecções respiratórias anteriores, somente foi considerado um novo episódio de infecção respiratória após o intervalo de 7 dias ou mais entre o final e o reinício dos sintomas.

3.3 – Aprovação Institucional e Questionários

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa pelo Parecer nº 062/2001 no dia 11 de Junho de 2001 na cidade de São José do Rio Preto (Anexo I).

Um termo de consentimento para colheita das amostras foi obtido de todos os responsáveis pelas crianças incluídas no estudo (Anexo II). Além deste, foram utilizados dois questionários na pesquisa:

- um para coletar dados gerais de identificação da criança, idade e sexo; antecedentes pessoais e familiares; história da infecção respiratória como presença e caracterização de chiado e se ocorreram internações anteriores (Anexo III);

- outro de dados clínicos atuais como dados da história atual; dados do exame físico atual; dados da medicação em uso; dados complementares como internação atual e uso de O₂ (Anexo IV).

3.4 - Colheita e processamento das amostras de secreção de nasofaringe

A colheita do material da secreção de nasofaringe foi realizada por um único enfermeiro. A secreção nasal foi fluidificada com 1 mL de *Ringer-Lactato* (Sanobiol – Brasil), e posteriormente colhida com *swab* e sonda de aspiração neonatal estéril. Os aspirados foram armazenados em frascos identificados com nome e número de protocolo da criança, contendo 3 mL de *Ringer-Lactato* (Sanobiol – Brasil). Depois de colhidos, os aspirados nasais foram acondicionados em caixa térmica com gelo e encaminhados ao laboratório para processamento.

Os aspirados nasais recém colhidos foram diluídos em PBS pH 7,2 (*Phosphate Buffered Saline* – NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄). Em seguida, estas amostras foram divididas em alíquotas de 250µL e tratadas com antibiótico (10mg/mL de penicilina/estreptomicina, Cultilab – Brasil) e antifúngico (50mg/mL de sulfato de gentamicina, Cultilab – Brasil). Após um período de incubação de 1h, foram adicionados 750µL de Trizol-LS (*Life Technologies, Grand Island, NY, USA*) e o material foi estocado em freezer –80°C para posterior extração de RNA.

3.5 - Extração de RNA

Às alíquotas de cada amostra contendo Trizol-LS foram adicionados 200µL de clorofórmio (Merck, *Germany*), homogeneizado em vórtex durante 15 segundos e incubado no gelo por 5 minutos. O material foi então centrifugado a 11.300g por 15 minutos a 4°C.

A seguir, foi alicotado 400µL de isopropanol (Sigma - USA) gelado em tubos eppendorfs de 2mL e o sobrenadante da amostra centrifugada anteriormente foi transferido para este novo tubo contendo o isopropanol, o qual foi homogeneizado e incubado por 15 minutos em gelo e seguindo-se de uma centrifugação a 11.300g por 15 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 800µL de etanol 75% (Merck, *Germany*) ao pellet, que foi seguido de uma centrifugação a 5.010g, por 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o tubo contendo o pellet foi deixado invertido sobre papel toalha por alguns minutos para secagem. O pellet foi ressuspendido em 50µL de água MiliQ tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato – Sigma - USA) contendo 80U de inibidor

RNAse (*RNAse OUT* – *Invitrogen* – USA- 40U/μL) por amostra e transferido para novos tubos eppendorfs de 0.2mL.

3.6 - Transcrição Reversa (RT-PCR)

A transcrição reversa foi realizada com o *High Capacity cDNA Archive Kit* – *Applied Biosystems* (USA), conforme instruções do fabricante. O cDNA foi transcrito a partir dos 50μL de RNA obtido na extração, no qual foi adicionado 10μL de 10X RT *Random Primers*; 10μL de 10X RT Buffer, 4μL de 25X dNTP mixture (100mM), 5μL de *Multiscribe* (Transcriptase Reversa – 50U/μL) e 21,0μL de água MiliQ tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato – Sigma - USA), com uma reação de volume final de 100μL. A mistura foi submetida ao *GeneAmp® PCR System 9700 Thermocycler* (*Applied Biosystems*) a 25°C por 10 minutos para ação da Transcriptase Reversa, 37°C por 120 minutos, mantido a 4°C por 10 minutos e estocado em freezer –20°C.

3.7 - Amplificação

Para amplificação das amostras e detecção de oito tipos diferentes de vírus respiratórios (*Metapneumovirus Humano* (hMPV), *Vírus Sincicial Respiratório* (RSV), *Influenza Vírus A e B* (FLUA e FLUB), *Parainfluenza Vírus Humano 1, 2 e 3* (PIV-1, PIV-2 e PIV-3) e *Picornavírus* (Pic)), foi utilizado o método de PCR. Foram utilizados *primers* específicos (Quadro I) para a detecção de cada vírus. Os *primers* utilizados nas reações de

Materiais e Métodos

PCR para a detecção do RSV foram *primers* complementares a uma região conservada do gene da proteína F, e para o hMPV os *primers* utilizados amplificaram uma região do gene F, que também codifica a proteína de fusão. Já para a detecção dos vírus FLUA e FLUB foi amplificada uma região do segmento 8, que codifica as proteínas não-estruturais NS1 e NS2. Na amplificação de fragmentos dos PIV-1, 2 e 3, os *primers* amplificaram uma região do gene HN, que codifica a glicoproteína hemaglutinnina-neuraminidase. O *primer* específico do *Picornavírus* amplifica a região 5' UTR.

Cada reação do PCR consistia em 2,5µL de tampão 10X (75mM *Tris*-HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 20mM (NH₄)₂SO₄) contendo 0.2mM MgCl₂, 0,5µL de dNTP (10mM), 1,25µL de cada um dos 8 *primers* (*sense* e *anti-sense* – 10 pmol/µl), 0,5µl (2 unidades) de Taq polimerase (*Biotoools*, Espanha) e 16,0µL de água MiliQ. Uma alíquota de 3µL de cDNA foi adicionada, resultando em um volume final da reação de 25,0µL.

As reações foram submetidas ao *GeneAmp® PCR System 9700 Thermocycler* (*Applied Biosystems*) à 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos e um passo de extensão de 72°C por 7 minutos. Após término, foram mantidas a 4°C e depois estocadas em freezer -20°C.

Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,0% (GIBCO-BRL, NY, USA) contendo 0,5µg/µL de Brometo de etídio em tampão *Tris*-Borato-EDTA 1x (90mM de *Tris*, 90mM de ácido Bórico e 2mM de EDTA pH 8,0) e visualizados em trans-iluminador com luz ultravioleta (UV).

Materiais e Métodos

Em todas as reações foram utilizados controles positivos, proveniente de amostra de RSV purificado em cultura celular Hep-2, para o qual foram utilizados *primers* específicos, que amplificaram uma região do gene F (Quadro I). Um controle negativo também foi utilizado, o qual consistiu dos mesmos reagentes usados na reação de PCR e ausência de material genético.

Quadro I – Sequência de *primers* que foram utilizadas para investigar a presença de vírus respiratório na creche.

Vírus	Primer	Sequência	pb (*)	Ref.
RSV	F1 sense (+)	5'- AAC AGT TTA ACA TTA CCA AGT GA -3'	357	Mazzulli <i>et al.</i> , 1999
	R1 anti-sense (-)	5'- TCA TTG ACT TGA GAT ATT GAT CG -3'		
HMPV	F1 sense (+)	5'- GAG CCA ATT GAA AAT CCC AGA CA -'	343	Falsey <i>et al.</i> , 2003
	R1 anti-sense (-)	5'- GAA AAC TGC CGC ACA ACA TTT AG-3		
FLUA	F1 sense (+)	5'- CTA AGG GCT TTC ACC GAA GA -3'	191	Claas <i>et al.</i> , 1992
	R1 anti-sense (-)	5'- CCC ATT CTC ATT ACT GCT TC-3',		
FLUB	F1 sense (+)	5'- ATG GCC ATC GGA TCC TCA AC -3'	240	Claas <i>et al.</i> , 1992
	R1 anti-sense (-)	5'- TGT CAG CTA TTA TGG AGC TC-3'		
PIV-1	F1 sense (+)	5'-CCG GTA ATT TCT CAT ACC TAT G -3'	317	Echevarria <i>et al.</i> , 1998
	R1 anti-sense (-)	5'- CCT TGC AGC GGA GTT GTT AAG -3'		
PIV -2	F1 sense (+)	5'- CCA TTT ACC TAA GTG ATG GAA T -3'	204	Echevarria <i>et al.</i> , 1998
	R1 anti-sense (-)	5'- GCC CTG TTG TAT TTG GAA GAG A -3'		
PIV -3	F1 sense (+)	5'- ACT CCC AAA GTT GAT GAA AGA T-3'	102	Echevarria <i>et al.</i> , 1998
	R1 anti-sense (-)	5'- TAA ATC TTG TTG TTG AGA TTG A -3'		
PIC	F3 sense (+)	5'- GGC CCC TGA ATG YGG CTA A -3'	114	Arruda <i>et al.</i> , 1993
	R3 anti-sense (-)	5'- GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA -3'		

(*) pb= Tamanho esperado do produto de PCR em pares de base.

3.8 – Tipagem dos *Picornavírus* para detecção de *Rhinovírus* ou *Enterovírus* por meio de Sequenciamento direto

A detecção de *Rhinovírus Humano* (HRV) e/ou *Enterovírus Humano* (HEV) iniciou-se com uma reação de PCR que consistiu em 5µL tampão 10X (75mM Tris-HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 20mM (NH₄)₂SO₄), 4,8µL de MgCl₂ 25mM, 2,4µL de dNTP 10mM, 2µL dos *primers* OL26 e OL27 a 20 pmol (Tabela 1), 1,5µL de *High Fidelity PCR Enzyme*

Materiais e Métodos

Mix (Fermentas Life Sciences), água mili-Q q.s.p e 8µL de cDNA para um volume final de 40µL. Amostras de *Rhinovírus* positivas foram utilizadas como controles positivos e os controles negativos foram compostos de todos os reagentes da reação de PCR exceto material genético.

A ciclagem utilizada nesta reação foi de 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 1' 30", 48°C por 1' 30", 72°C por 1 minuto, uma extensão a 72°C por 10 minutos. Após término, foram mantidas a 4°C.

Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,0% (GIBCO-BRL) contendo 0,5µg/µL de Brometo de etídio em tampão *Tris*-Borato-EDTA 1x (90mM de *Tris*, 90mM de ácido Bórico e 2mM de EDTA pH 8,0) e visualizados em trans-iluminador com luz ultravioleta (UV).

Tabela 1 – *Primers* utilizados nas reações de PCR para a detecção de HRV e/ou HEV

<i>Primers</i>	Região Gênica	Sequência	Referência
<i>Primer</i> OL26	Poliproteína inicial	5'- GCA CTT CTG TTT CCC C -3'	Arruda <i>et al.</i> , 1993
<i>Primer</i> OL27	Poliproteína inicial	5'- CGG ACA CCC AAA GTA -3'	Arruda <i>et al.</i> , 1993

3.8.1 – Purificação dos amplicons

Os produtos de PCR foram purificados em coluna com o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) conforme instruções do fabricante.

Um gel de agarose 1,0% (GIBCO-BRL) contendo 0,5µg/µL de Brometo de etídio em tampão *Tris*-Borato-EDTA 1x (90mM de *Tris*, 90mM de ácido Bórico, 2mM de EDTA pH 8,0) foi feito para confirmar se não houve perda da amostra durante a purificação.

3.8.2 – Reação de Marcação Fluorescente com *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*.

Na reação de marcação fluorescente foram utilizados 2,0µL de 5X *Sequencing Buffer* (Save Money), 2,0µL de *Big Dye*, 0,4µL de cada *primer* (OL26 e OL27 – 20 pmol) e completou-se com 5,6µL do produto de PCR purificado, para um volume final de 10,0µL.

A ciclagem foi realizada em *GeneAmp® PCR System 9700 Thermocycler* (Applied Biosystems) e as condições de termociclagem foram de 96°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos e mantidos a 4°C após término.

3.8.3 – Precipitação

Para a precipitação foi adicionado 60µL de isopropanol 100% (Merck – Germany) e 30µL de água ultrapura em cada amostra (10µL), homogeneizando em *vortex* brevemente e deixou-se 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, a placa foi centrifugada a 1.300g a 20°C por 30 minutos (*Centrifuge 5804R – Eppendorf*).

O sobrenadante foi descartado e deixou-se secando com a placa invertida ao abrigo da luz á temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse tempo, a placa foi centrifugada invertida a 19.6g a temperatura de 20°C por 1 minuto e em seguida, adicionou-se 150µL de

etanol 75% (Merck – *Germany*). A placa foi então centrifugada por 30 minutos a 1.300g a temperatura de 20°C.

O sobrenadante foi novamente descartado e a placa foi invertida em papel absorvente a temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida foi centrifugada invertida a 19.6g a temperatura de 20°C por 1 minuto. Após terminar a centrifugação, a placa foi armazenada a -20°C ao abrigo da luz.

3.8.4 – Sequenciamento

Após a precipitação, foram adicionados em cada amostra 10µL de Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*- USA) seguido de uma precipitação de 1 minuto em velocidade máxima à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95°C e posteriormente mantidas em gelo por 2 minutos e prontas então para serem seqüenciadas. As amostras foram seqüenciadas em um seqüenciador 3130xl *Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*).

3.9 – Tipagem

Todos os resultados moleculares foram analisados juntamente com informações obtidas de um questionário que os responsáveis pelas crianças responderam (anexo IV).

Todas as seqüências das amostras de *Rhinovírus* e ou *Enterovírus* foram analisadas quanto à homologia com a sequência correspondente à região 5' não traduzida do genoma dos respectivos vírus através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) NCBI (*National Center of Biotechnology Information* – www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Materiais e Métodos

A qualidade das seqüências foi verificada pelo software *Eletropherogram Quality Analysis* disponível on-line em <http://www.biomol.unb.br/phph>. A figura 8 ilustra em eletroferograma gerado com o sequenciamento de um fragmento do genoma de um *Rhinovírus*.

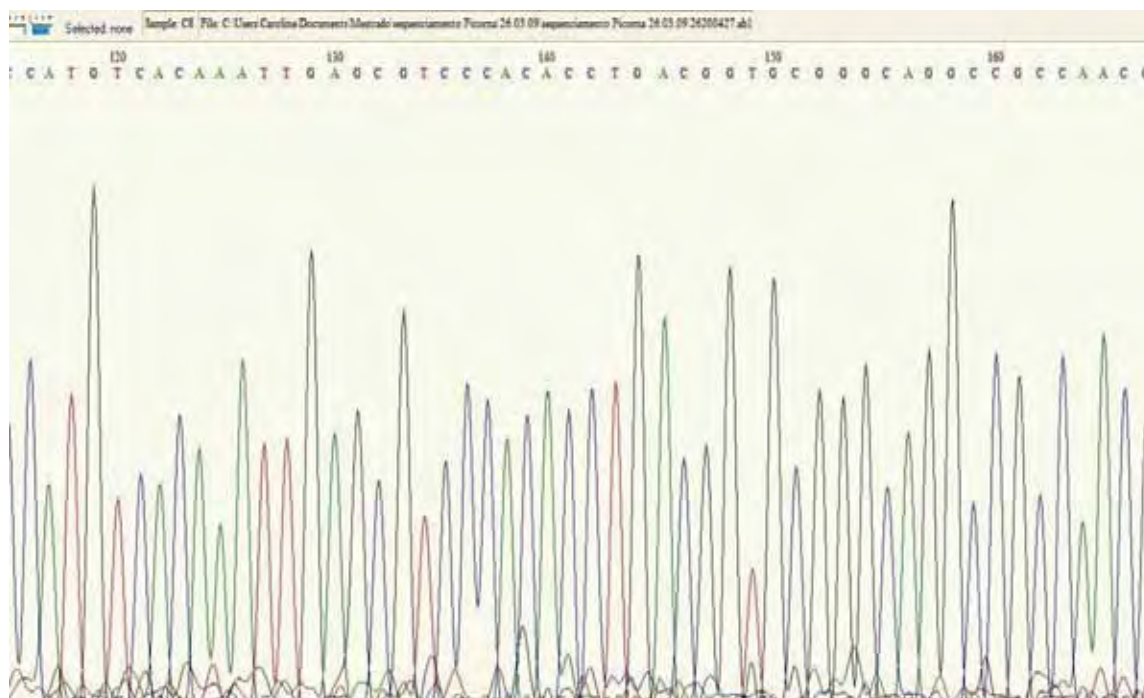


Figura 8: Eletroferograma do sequenciamento de uma amostra positiva de *Rhinovírus*.

3.10 - Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o *Software Minitab Statistical* do *Windows*, versão 12.22, e as diferenças foram consideradas significantes $p < 0.05$. Foi utilizado o Teste de *Fischer*.

Materiais e Métodos

Uma análise dependente entre a presença de doença e o patógeno também foi considerada e analisada. Estas análises foram realizadas pelo professor Dr. José Antônio Cordeiro da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 – Características da população de estudo

A creche municipal “Maria Inês Arnal” comporta, em média, 180 crianças, mas a população de estudo foi apenas de crianças que apresentavam algum dos sintomas característicos de uma infecção respiratória. Assim, a população de estudo foi composta por 120 crianças e um total de 279 amostras, já que a maioria das crianças teve mais de uma coleta (Tabela 2). Destas crianças, 73 eram do sexo masculino e 47 do sexo feminino, e apresentavam idade mínima de 3 meses e máxima de 69 meses.

Tabela 2 – Relação do número de crianças que apresentavam sintomas de infecções respiratórias que freqüentavam a Creche Municipal “Maria Inês Arnal” em São José do Rio Preto, e idade apresentada na data da primeira coleta das amostras.

Idade das crianças (Meses)	Número de crianças com sintoma de infecção respiratória
1 – 12	11
13 – 24	34
25 – 36	21
37 – 48	28
49 – 60	19
≥ 60	7
Total	120

Todas as amostras coletadas foram analisadas pelo uso da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose. A figura 9 ilustra um exemplo de gel que amplificou fragmentos correspondentes ao *Picornavírus*. Os produtos amplificados pelos *primers* específicos utilizados na PCR pa-

Resultados

ra detecção dos oito vírus respiratórios foram de 343pb para o hMPV, 191pb para o FLUA, 240pb para o FLUB, 317pb para PIV-1, 204pb para o PIV-2, 102pb para o PIV-3 e 114pb para o PIC. Na detecção do RSV, o produto amplificado nas reações de PCR foram de 650 pb.

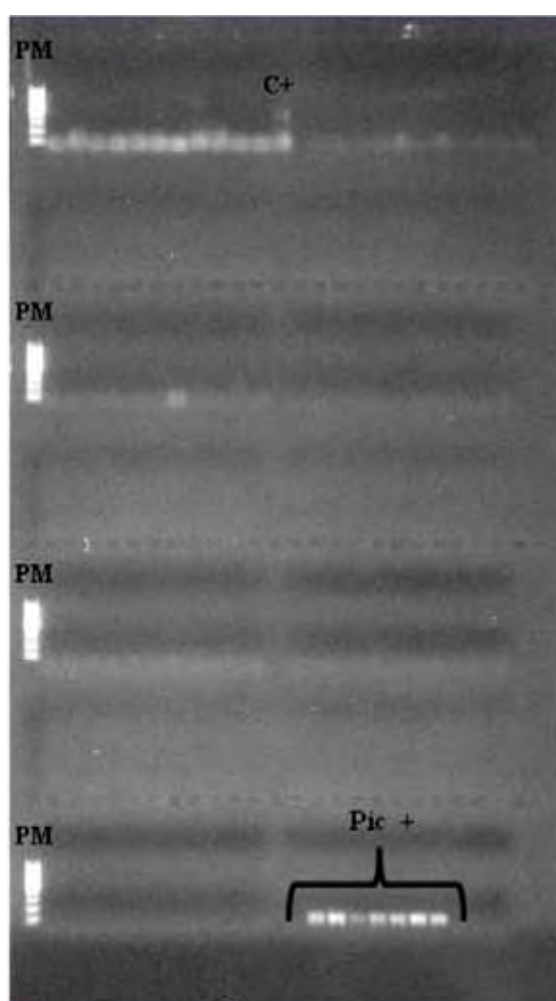


Figura 9: Resultados da PCR em gel de agarose. (PM): Marcador de peso molecular 100 pares de base; (C+): Controle positivo da reação; (Pic): *Picornavirus*

Resultados

Das 279 amostras, 27,2% (76/279) foram positivas para pelo menos um dos vírus respiratórios analisados. Dentre essas amostras positivas, encontrou-se 84,2% (64/76) de *Picornavírus*, sendo 76,3% (58/76) de *Rhinovírus* e 7,9% de *Enterovírus* (6/76), 7,9% (6/76) de RSV, 1,3% (1/76) de hMPV, 2,6% (2/76) de FLUA, 2,6% (2/76) de PIV-1 e 1,3% (1/76) de PIV-2, conforme ilustrado na figura 10. Os vírus FLUB e PIV-3 não foram detectados em nenhuma das nossas amostras.

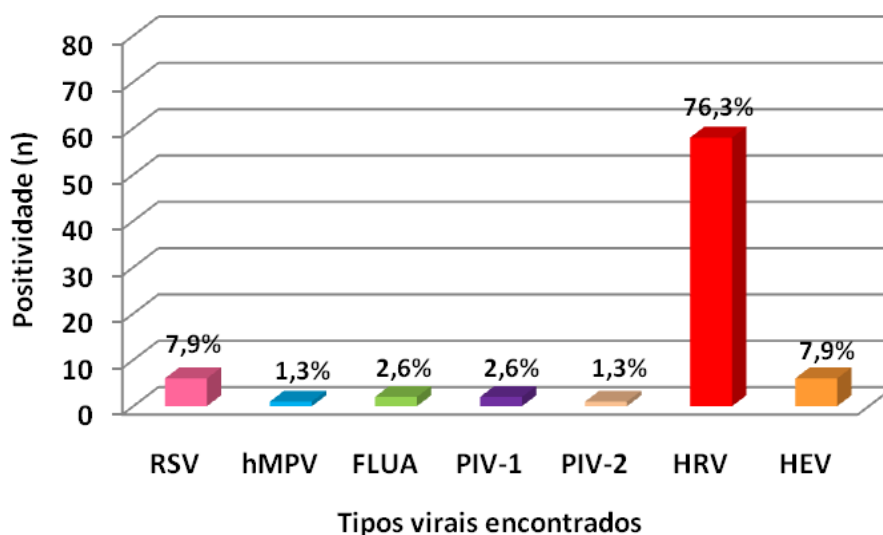


Figura 10 – Prevalência dos vírus respiratórios de amostras de aspirados da nasofaringe colhidas de crianças que freqüentavam a Creche Municipal “Maria Inês Arnal” em São José do Rio Preto no período entre Junho de 2004 a Setembro de 2005

Resultados

Nem todos os indivíduos que apresentavam sintomas de infecção respiratória foram positivos para algum vírus, sendo que apenas 48,3% (58/120) foram realmente acometidas por alguma infecção respiratória viral. Os meninos foram infectados em 74,1% (43/58) dos casos e as meninas em 41,3% (24/58). Esses dados não apresentaram resultados estatisticamente significantes. Tiveram casos em que a mesma criança foi acometida mais de uma vez por um vírus em diferentes coletas. O vírus mais prevalente para ambos os sexos foi o *Rhinovírus*, sendo o RSV mais prevalente em crianças do sexo feminino e *Enterovírus* em crianças do sexo masculino, porém, não houve uma associação significativa entre a presença do vírus e sexo. Esses resultados estão evidenciados na tabela 3.

Tabela 3: Distribuição das infecções respiratórias virais em crianças de creche no período de junho de 2004 a setembro de 2005 de acordo com o sexo das crianças.

Tipo Viral	Masculino	Feminino
RSV	1	5
hMPV	0	1
FLUA	1	1
PIV-1	2	0
PIV-2	1	0
HRV	33	17
HEV	5	0
Total	43	24

RSV: *Vírus Sincicial Respiratório*; hMPV: *Metapneumovirus Humano*; FLUA: *Influenzavirus* do tipo A; PIV1 e PIV2: *Parainfluenzavirus* do tipo 1 e 2; HRV: *Rhinovírus*; HEV: *Enterovírus*.

Quanto à distribuição etária das crianças que apresentavam infecção respiratória, podemos observar (figura 11) que crianças que tinham entre 1 e 3 anos de idade foram

Resultados

mais acometidas por vírus respiratórios. Porém, para esta faixa etária não houve uma associação significativa com a presença viral.

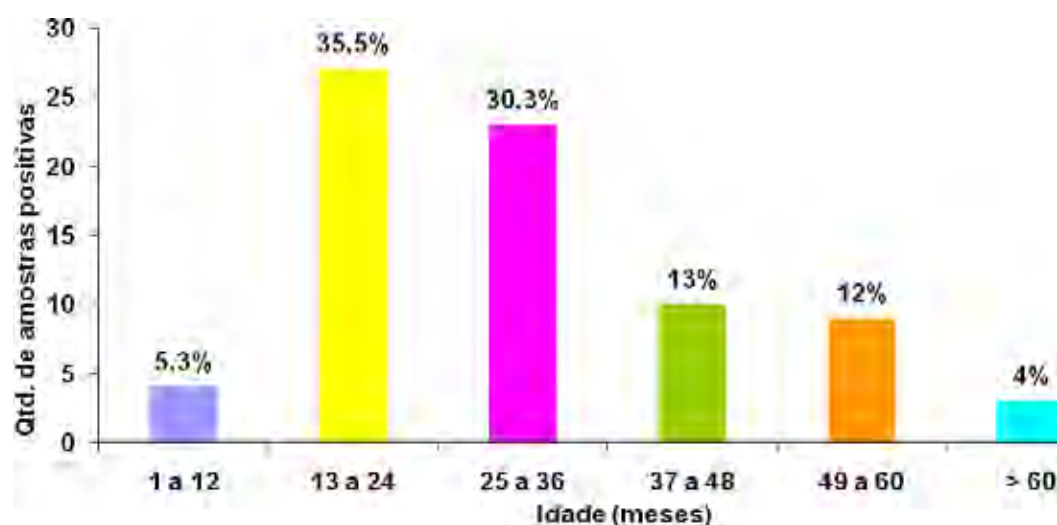


Figura 11 – Relação da positividade total das amostras com a faixa etária das crianças infectadas com vírus respiratórios.

Foi analisada também a distribuição etária das crianças da creche de acordo com cada um dos oito tipos virais. A figura 12 ilustra esta distribuição.

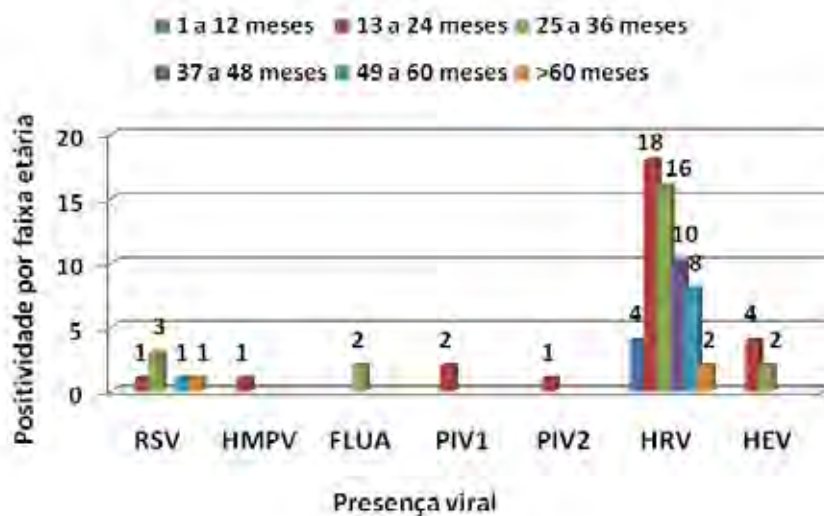


Figura 12 - Relação de cada vírus respiratório com a distribuição etária das crianças. Idade em meses. RSV: Vírus Sincicial Respiratório; hMPV: Metapneumovirus Humano; FLUA: Influenzavirus Tipo A; PIV-1 e PIV-2: Parainfluenzavirus Tipo 1 e Tipo 2; HRV: Rhinovírus Humano; HEV: Enterovírus Humano.

Como pode ser visto na figura 12, dentre as crianças que apresentaram infecção respiratória por *Rhinovírus*, pode-se observar que as mais acometidas tinham entre 1-4 anos e esses casos positivos foram diminuindo de acordo com o aumento da idade da criança. A média de idade das crianças positivas para *Rhinovírus* no primeiro episódio foi de 31 meses, porém não foi encontrada nenhuma evidência de associação estatisticamente significativa de idade com infecção ($p=0,379$).

Quando foi analisado o consumo de tabaco pelos responsáveis das crianças verificou-se que aproximadamente 50% (38/76) das crianças infectadas por vírus conviviam com fumantes nos seus lares e que em 63% (48/76) dos casos as crianças fizeram inalação em postos de saúde. No histórico médico das crianças observou-se ainda que 22,3% (17/76) já tiveram internação em enfermarias.

Resultados

A análise da situação sócio-econômica das famílias mostrou que a renda familiar da maioria das crianças, em 88% (67/76), variou de 1 a 3 salários mínimos, 7,9% (6/76) com renda menor que 1 salário mínimo e 4% (3/76) apresentavam renda que variava de 3 a 10 salários mínimos, como mostra a figura 13. Várias crianças do nosso estudo, 41,3% (24/58), conviviam com mais de 5 pessoas em casa, além de 17,2% (10/58) ter mais de 3 irmãos.

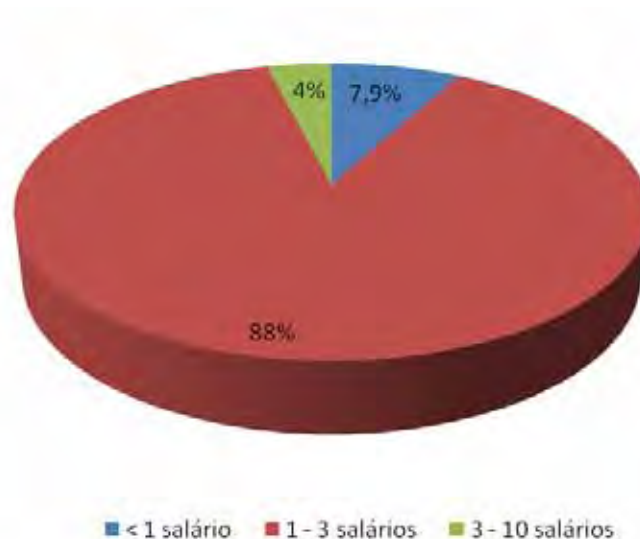


Figura 13 – Gráfico ilustrando a renda familiar das crianças com infecções respiratórias que freqüentavam a creche municipal “Maria Inês Arnal” em São José do Rio Preto.

4.2 – Sintomas diagnosticados

Os resultados das análises quanto à relação dos sintomas com a presença de vírus, mostra a ausência de sintomas graves, e geralmente a não necessidade de internação durante o período da infecção respiratória.

Resultados

Os sintomas mais frequentes na população de estudo foram a coriza, que foi diagnosticada em 89,5% (68/76) das amostras positivas, seguida pela tosse em 67,1% (51/76), chiado em 5,2% (4/76), obstrução nasal também em 4% (3/76) e febre em 2,6% (2/76). Alguns sintomas como falta de ar e sibilo, considerados comuns em infecções respiratórias agudas, não foram observados na nossa população de estudo (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição dos vírus respiratórios detectados e os sintomas apresentados pelas crianças que frequentavam a Creche Municipal “Maria Inês Arnal”.

Sintomas \ Vírus	Amostras	RSV	hMPV	FLUA	PIV-1	PIV-2	HRV	HEV
	Positivas							
Coriza	68 (89,5%)	5 (6,5%)	1 (1,3%)	2 (2,6%)	2 (2,6%)	1 (1,3%)	52 (68,4%)	5 (6,5%)
Tosse	51 (67,1%)	4 (5,2%)	0	2 (2,6%)	2 (2,6%)	1 (1,3%)	37 (48,6%)	5 (6,5%)
Chiado	4 (5,2%)	0	0	0	2 (2,6%)	1 (1,3%)	2 (2,6%)	0
Obstrução Nasal	3 (4%)	0	0	0	1 (1,3%)	1 (1,3%)	2 (2,6%)	0
Febre	2 (2,6%)	1 (1,3%)	0	0	0	0	0	1 (1,3%)

RSV: *Vírus Sincicial Respiratório*; hMPV: *Metapneumovirus Humano*; FLUA: *Influenzavirus* do tipo A; PIV-1 e PIV-2: *Parainfluenzavirus* do tipo 1 e 2; HRV: *Rhinovírus*; HEV: *Enterovírus*.

Os sintomas mais prevalentes em cada episódio de infecção também foram analisados para ver se a cada re-infecção ocorreria uma queda desses sintomas. Os sintomas prevalentes foram: tosse, que foi reportado acima de 30% em todos os episódios, coriza encontrada em mais de 80% das crianças em cada episódio e chiado recorrente que

Resultados

também foi encontrado acima de 50% das crianças em todas as re-infecções. Podemos observar que a cada episódio o número de crianças acometidas vai diminuindo e que a duração média desses sintomas também. Porém, a partir do quinto episódio a duração dos sintomas volta a aumentar, apesar de uma diminuição brusca no número de indivíduos acometidos a partir deste episódio. Porém, esses dados não apresentaram associação quando foi realizada a análise estatística. Esses resultados podem ser analisados na tabela 5.

Tabela 5: Distribuição de cada episódio com os sintomas reportados nas crianças que freqüentavam a creche municipal “Maria Inês Arnal” em São José do Rio Preto.

Episódios Sintomas	Episódio 1 (n=120)	Episódio 2 (n=81)	Episódio 3 (n=46)	Episódio 4 (n=21)	Episódio 5 (n=8)	Episódio 6 (n=3)
Tosse	88 (73,3%)	52 (64,2%)	20 (43,5%)	7 (33,3%)	5 (62,5%)	1 (33,3%)
Coriza	110 (91,6%)	73 (90,1%)	46 (100%)	19 (90,5%)	7 (87,5%)	3 (100%)
Chiado	4 (3,3%)	3 (3,70%)	1 (2,17%)	0	0	0
Febre	1 (0,83%)	1 (1,23%)	1 (2,17%)	0	0	0
Chiado recorrente	68 (56,6%)	43 (53,1%)	24 (52,2%)	16 (76,2%)	5 (62,5%)	3 (100%)
Duração sintomas (média/dias)	25,11	23,33	20,27	15,58	23,41	26,28

Os *Rhinovírus* foram os vírus mais prevalentes na população de estudo. O número de crianças que sofrem infecções repetidas vai diminuindo a cada novo episódio como pode ser visto no quadro II. Os sintomas prevalentes foram tosse, coriza e chiado recorrente.

Resultados

te. A febre não foi reportada em nenhum caso de infecção por *Rhinovírus*, evidenciando que este sintoma não é uma característica desse agente viral. Também pode-se notar a duração dos sintomas que teve mínimo de 5 dias e máximo de 74 dias.

Quadro II: Distribuição de cada episódio com os sintomas reportados nas crianças positivas para *Rhinovírus* que freqüentavam a creche municipal “Maria Inês Arnal” em São José do Rio Preto.

<i>Rhinovírus</i>					
Sintomas Prevalentes	Episódio 1 (n=29)	Episódio 2 (n=14)	Episódio 3 (n=10)	Episódio 4 (n=3)	Episódio 5 (n=2)
Tosse	20 (69%)	10 (71,4%)	5 (50%)	1 (33,3%)	1 (50%)
Coriza	26 (89,6%)	11 (78,5%)	10 (100%)	3 (100%)	2 (100%)
Chiado	2 (7%)	0	1 (10%)	0	0
Febre	0	0	0	0	0
Chiado Recorrente	19 (65,5%)	4 (28,5%)	6 (60%)	1 (33,3%)	1 (50%)
Duração sintomas (dias) (mínimo/máximo)	5-74	10-66	9-43	7-18	12-41

Além dos sintomas mais freqüentes, alguns diagnósticos clínicos também foram observados neste estudo. Das amostras positivas para algum patógeno viral, 97,3% (74/76) delas tiveram resfriado diagnosticado e 69,7% (53/76) apresentaram resfriado recorrente.

Durante nosso estudo, foram observados também vários casos de recidiva de infecção, 29% (22/76) das amostras tiveram casos de infecções repetidas, por HRV, HEV, FLUA, PIV-2 ou RSV, ou seja, um novo episódio de infecção respiratória, respeitando o

Resultados

intervalo de 7 dias ou mais entre o final e o reinício dos sintomas, sendo essas crianças acometidas pelo mesmo patógeno ou não. A maioria das re-infecções, 82% (18/22), foram de *Rhinovírus*. A figura 14 evidencia esses dados.

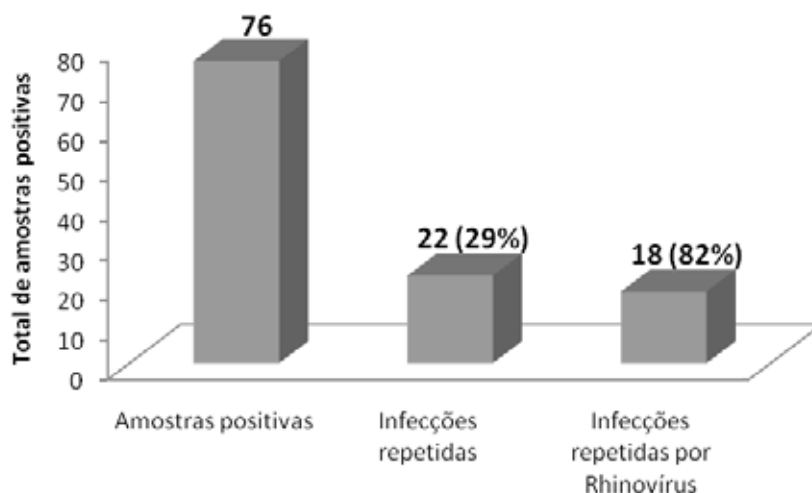


Figura 14 – Número total de infecções repetidas e infecções repetidas por *Rhinovírus* das crianças que freqüentavam a creche municipal “Maria Inês Arnal” em São José do Rio Preto.

4.3 – Sazonalidade dos vírus respiratórios estudados

Com relação à distribuição sazonal das infecções respiratórias virais nas crianças da creche, notou-se que em 2004 as infecções compreenderam o período de junho a novembro, com pico em agosto e novembro. Em junho, *Rhinovírus* e *Enterovírus* foram detectados. Em julho, HRV e RSV foram observados e em agosto um pico de HRV foi observado, seguido de HEV e PIV-2. No mês de setembro, apenas PIV-1 foi detectado e em outubro novamente HRV e HEV. Em novembro, ocorreu novamente outro pico de HRV e em dezembro apenas RSV foi detectado (figura 15).

Resultados

Em 2005, as infecções ocorreram entre os meses de fevereiro e setembro, com pico de HRV em maio (figura 15). Em fevereiro apenas HRV foi encontrado e em março apenas RSV. Em abril, FLUA e HRV; em maio um pico de HRV foi observado e alguns casos de HEV, além de RSV e hMPV. Do mês de junho até setembro foram detectados apenas casos de HRV.

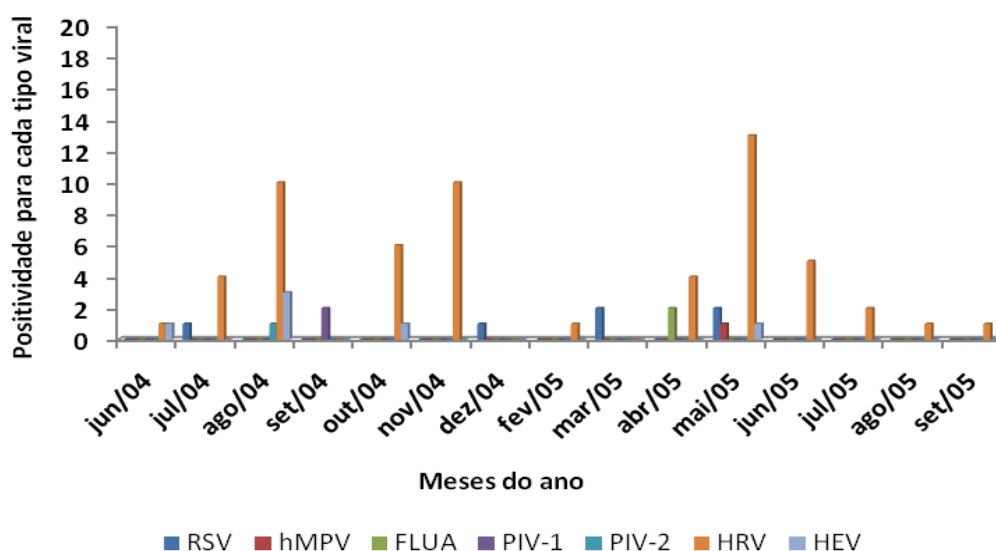


Figura 15: Distribuição sazonal de infecções respiratórias virais em crianças de creche no período de junho de 2004 a setembro de 2005. RSV: *Vírus Sincicial Respiratório*; hMPV: *Metapneumovirus Humano*; FLUA: *Influenzavirus* do tipo A; PIV-1 e PIV-2: *Parainfluenzavirus* do tipo 1 e 2; HRV: *Rhinovírus Humano*; HEV: *Enterovírus Humano*.

Como o *Rhinovírus* foi o agente viral predominante em nossa população de estudo, observamos a distribuição sazonal deste vírus durante os meses dos anos de 2004 e 2005 podemos notar que em 2004 ocorreu pico de infecção em agosto, outubro e novembro. Nenhum caso positivo foi encontrado nos meses de setembro e dezembro. Já em 2005, pico

Resultados

de infecção foi em maio, com redução gradativa dos casos positivos nos meses seguintes, como mostra a figura 16.

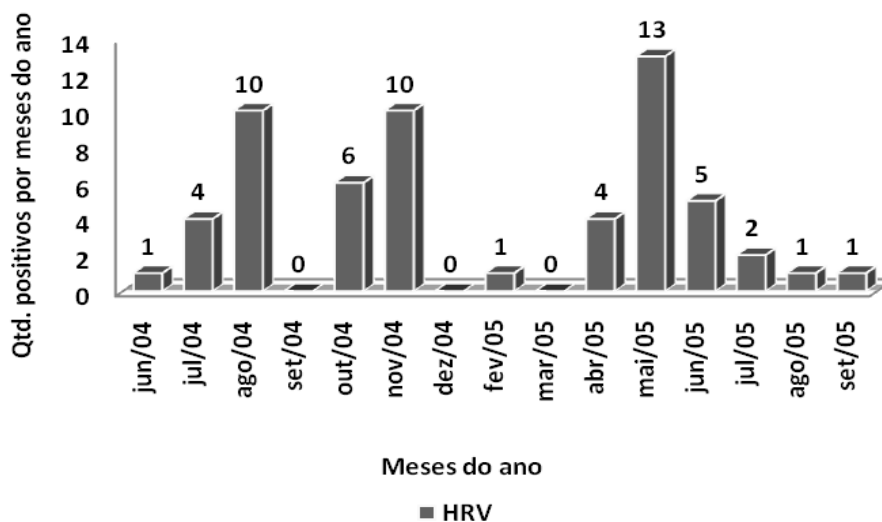


Figura 16– Distribuição mensal das amostras positivas de *Rhinovírus* durante os meses de Junho de 2004 a Setembro de 2005 .

A sazonalidade do *Rhinovírus* também foi analisada de acordo com as estações do ano e pode-se notar que em 2004 infecções respiratórias de HRV ocorreram na primavera e no inverno e no ano de 2005 no outono e no inverno. A detecção de *Rhinovirus* diminuiu drasticamente apenas no verão (figura 17). Esses dados foram analisados estatisticamente pelo teste exato de Fisher ($p=0,81$), porém não houve evidência de efeito da sazonalidade.

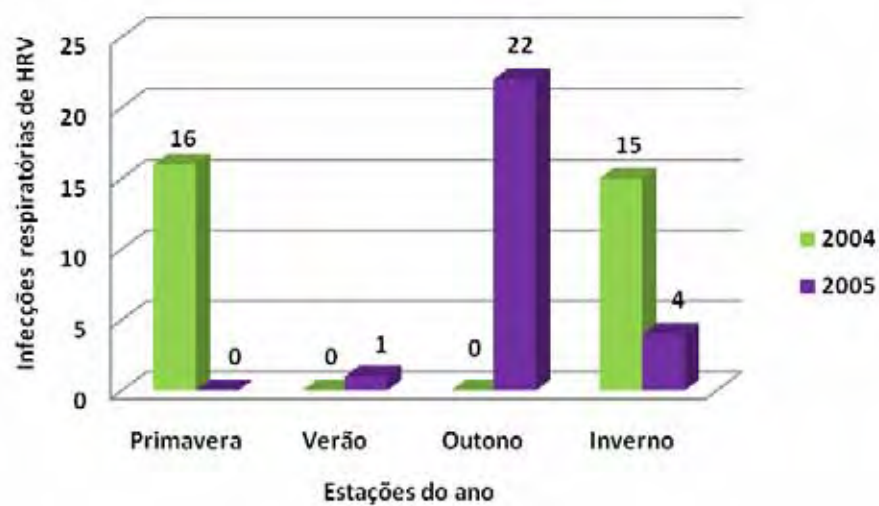


Figura 17 – Distribuição sazonal das amostras positivas de *Rhinovírus* das crianças que frequentavam a creche municipal “Maria Inês Arnal” em São José do Rio Preto no período de Junho de 2004 a Setembro de 2005.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, um total de 279 amostras foi coletado de crianças que freqüentavam uma creche em São José do Rio Preto. Dessas amostras, 27,2% apresentou etiologia de origem viral, o que está de acordo com resultados encontrados na literatura.

Se compararmos com populações de um estudo realizado com crianças admitidas na Santa Casa de São Paulo, foram detectados agentes virais em 30,2% das amostras (Pecchini *et al.*, 2008). Ordás *et al* (2006), pesquisou na Espanha crianças atendidas em um hospital pediátrico e que apresentavam sintomas de infecções do trato respiratório inferior e superior e nas amostras coletadas por ele 49,8% eram positivas para pelo menos um agente viral, dentre eles o RSV e *Influenza A*. Na Índia, Yeolekar *et al* (2008), encontrou em amostras de aspirado nasofaríngeo de crianças admitidas em um hospital pediátrico que apresentavam infecções do trato respiratório, 37,1% de positividade de vírus respiratório. Estes relatos confirmam a faixa de positividade da nossa população uma vez que se trata de populações hospitalizadas, e a nossa de população de creche, que não apresentou casos de internação.

No nosso estudo, os *Rhinovírus* foram predominantemente os vírus mais encontrados nas amostras estudadas com 76,3% de detecção, seguido de outro vírus da família dos *Picornaviridae*, os *Enterovírus* com 7,9% de positividade.

Alguns membros da família *Picornaviridae* como *Rhinovírus* e *Enterovírus* são os mais comuns agentes causadores de infecções respiratórias em países desenvolvidos (Ruohola *et al.*, 2000). As infecções respiratórias das quais apenas *Rhinovírus* é detectado,

ou seja, sem estar associado com outro patógeno, são 13 vezes mais comuns que infecções causadas pelo *Vírus Sincicial Respiratório* (van der Zalm *et al.*, 2009), mas poucos dados são disponibilizados sobre o papel desses picornavírus nas infecções do trato respiratório (Peltola & Ruuskanen, 2008).

Em um estudo realizado em Salvador com crianças de creche, das 264 amostras disponíveis para teste por RT-PCR e hibridização, 86 (33%) foram positivas para um picornavírus; 67 (78%) foram *Rhinovírus* positivos, e 19 (22%) foram *Enterovírus* positivos (Souza *et al.*, 2003).

No estudo de Bueno Campaña *et al* (2008), o grupo dos *Rhinovírus* (41,1%) também resultou ser a principal causa de infecções respiratórias em crianças menores de 6 meses de idade em ambiente extra hospitalar.

Em outro estudo realizado em Uberlândia, com crianças atendidas no hospital das clínicas com doença respiratória aguda, os *Rhinovírus* foram encontrados em 26,9% das 379 amostras estudadas e responsável também por 25% dos casos de bronquiolite (Costa, 2006). Apesar da alta positividade que os *Rhinovírus* apresentam, existem poucos dados no Brasil sobre as características e função desse tipo viral nas infecções respiratórias, dificultando assim o seu diagnóstico e evidenciando a necessidade de outros estudos para obtenção de novas informações.

Os nossos resultados para *Enterovírus* estão de acordo com estudos prévios, por exemplo, de Parody *et al* (2007) que detectou 5% de positividade para esse vírus em amostras de 130 pacientes que apresentavam sintomas de infecções respiratórias.

Além destes, foram detectados em nossas amostras 7,9% de RSV. Essa porcentagem é bastante baixa quando comparada com estudos prévios que encontraram acima de 30% de positividade para RSV (Pecchini *et al.*, 2008; Fabbiani *et al.*, 2009). Porém, em estudo realizado em Salvador com crianças de creche, o vírus RSV também foi detectado, por meio da técnica de imunofluorescência, em apenas 5 amostras de um total de 271 amostras (Souza *et al.*, 2003). Em Fortaleza, outro estudo também encontrou poucos casos de RSV positivos (Arruda *et al.*, 1991). A nossa sugestão é que esta baixa frequência seja devido à característica da população, que tem um convívio e um contato diário com tipos virais que possivelmente o sistema imunológico já teve experiência prévia.

A positividade encontrada no nosso estudo para hMPV foi de 1,3%. No Brasil, um outro estudo realizado em Uberlândia encontrou 2,8% de positividade de hMPV. No estudo de Reina *et al* (2008) a porcentagem encontrada também foi baixa, de 1,7% de positividade para hMPV. Porém, estudos anteriores de Garcia *et al* (2004) e Vicente *et al* (2003) detectaram 9% e 4,1% de positividade para hMPV, respectivamente.

O *Influenza A* foi encontrado em 2,6% das nossas amostras, porém, nenhuma amostra foi positiva para FLUB. A ausência de FLUB está de acordo com a literatura, onde Thomazelli *et al* (2007) também não encontrou positividade para esse vírus. Alguns resultados semelhantes podem ser observados em pesquisa realizada por indianos que detectaram 3,63% de FLUA, porém eles também encontraram 1,81% de amostras positivas para FLUB (Yeolekar, 2008).

Em um estudo realizado em Uberlândia, Brasil, Costa *et al* (2006) encontrou um maior número de infecções por *Influenza*. Os vírus FLUA e FLUB foram responsáveis por 9,5% das infecções respiratórias nesse trabalho. Ainda no Brasil, um estudo no Rio de Janeiro de Nascimento *et al* (1991), também mostrou uma baixa frequência de *Influenza A e B*, ficando assim em terceiro lugar entre os vírus frequentemente isolados.

O *Vírus Parainfluenza* foi detectado em apenas 3 amostras, sendo 2 casos (2,6%) de PIV-1 e 1 caso (1,3%) de PIV-2. Em um estudo na Itália (Fabbiani *et al*, 2009), das 237 amostras analisadas, nenhuma foi positiva para *Parainfluenza*, ao contrário de outro estudo realizado no Brasil, onde foi detectado 6,3% de positividade de PIV 1, 2 e 3. Na nossa pesquisa, nenhuma amostra positiva de PIV-3 foi detectada, porém na literatura, o tipo 3 é o mais freqüente entre os *Parainfluenza* e o tipo 1 e 2 não são detectados ou detectados em poucas amostras (Gröndahl *et al*, 1999).

Em nosso estudo, quando analisamos a positividade viral para algum dos oito vírus em relação ao sexo, observa-se uma porcentagem maior de infecções em crianças do sexo masculino (74,1%) em comparação com crianças do sexo feminino (41,3%). Vários estudos já relataram esta susceptibilidade elevada das crianças do sexo masculino às infecções respiratórias, dentre eles um estudo realizado na Amazônia que também observou que crianças do sexo masculino foram mais freqüentemente internadas por doenças respiratórias que aquelas do sexo feminino (Rosa *et al.*, 2008). Outro relato da literatura mostra que indivíduos do sexo masculino apresentam risco 1,5 vezes maior de internação por doenças respiratórias quando comparados aos do sexo feminino (Souza *et al.*, 2009). Entre outros fa-

tores, diferenças anatômicas entre os meninos como, por exemplo, o menor calibre da via aérea pode ser a causa dessa preponderância do sexo masculino quanto às infecções respiratórias (Post *et al.*, 1992; Iwane *et al.*, 2004).

De acordo Fiterman *et al* (2001) a idade representa um fator de risco na mortalidade por doenças respiratórias. As infecções respiratórias agudas são comuns em crianças e o risco dessas infecções diminui com o aumento da idade, o que está de acordo com nosso estudo que evidenciou que crianças menores de 3 anos foram mais acometidas por vírus respiratórios do que aquelas acima desta idade. Em um estudo realizado em Taiwan, das 523 crianças infectadas por algum vírus, 32,5% eram menores de 1 ano de idade, 37,7% tinham idade entre 1-3 anos e 17,2% entre 3-6 anos (Tsai *et al.*, 2001).

Crianças acometidas por HRV normalmente apresentam idade superior do que àquelas acometidas por outros vírus, como o RSV, por exemplo, que normalmente é detectado em crianças menores de um ano (Manoha *et al.*, 2007; Fabbiani *et al.*, 2009). Porém, no nosso estudo a maioria dos RSV positivos apresentava idade entre 25 – 36 meses. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a maioria das crianças da nossa população de estudo apresentavam idade superior a 1 ano de idade.

Com relação ao HRV, a média de idade que encontramos foi alta, de 31 meses, o que está de acordo com a literatura (Fabbiani *et al.*, 2009). Entretanto, ainda pouco se sabe sobre epidemiologia de *Rhinovírus*.

Quando observamos o fator fumo, quase metade das crianças convivia com fumantes. Em um estudo realizado para ver o impacto da convivência de fumantes com be-

Discussão

bês, foi observado que crianças que conviviam com fumantes em casa aumentavam em 50% o risco de ter uma infecção respiratória do que as crianças que não conviviam com pessoas que fumavam e este risco ainda aumentava com o número de cigarros fumados por dia (Blizzard *et al.*, 2003).

Essa exposição ao tabagismo também tem sido associada com novos casos de asma na infância e aumento da gravidade dos sintomas em crianças asmáticas (Charlton, 1994; Jinot & Bayard, 1994).

No nosso estudo observa-se que 88% das crianças tinham renda familiar que variava de 1 a 3 salários mínimos, além de 41,3% conviverem com mais de 5 pessoas em casa e 17,2% ter mais de 3 irmãos. Em estudo realizado por Macedo *et al.* (2007), 38,6% das crianças estudadas por ele apresentavam renda menor do que 1 salário mínimo e 37,4% tinham renda entre 1 e 3 salários.

O nível sócio-econômico há tempos é apontado como sendo um fator agravante no desenvolvimento de infecções respiratórias (Victora *et al.*, 1994). Geralmente, em famílias menos privilegiadas economicamente, a taxa de natalidade é quase sempre muito elevada e as condições de moradia não são adequadas (Victora, 1996). Há evidências de que o número de moradores e o número de crianças menores de cinco anos no domicílio aumentam as chances de desenvolvimento de doenças respiratórias (Victora *et al.*, 1988).

Os sintomas clínicos predominantes em nossa pesquisa foram coriza (89,5%) e tosse (67,1%). Esses resultados estão de acordo com estudos realizados por Thomazelli *et al*

(2007) onde um dos sintomas mais comuns encontrado foi tosse em 86% dos casos de infecção respiratória. Pecchini *et al* (2008) também encontrou como sintoma mais comum a tosse (92,3%) e a coriza (64,7%).

Porém, nesse estudo e em outro realizado na Índia (Yeolekar *et al.*, 2008), a febre também foi um sintoma comum encontrado em altas porcentagens, diferente dos nossos resultados. A nossa população de estudo apresentou apenas sintomas mais moderados, e isso pode ocorrer devido ao fato dessas crianças conviverem diariamente em creche e ter contato próximo com outras crianças, e estarem sendo expostas diariamente a cepas de diferentes tipos virais, dando à elas imunidade, sem apresentarem sintomas severos de infecção respiratória.

Outros sintomas como chiados, obstrução nasal e febre foram menos frequentes. O chiado recorrente foi encontrado com alta porcentagem em nossa pesquisa, acima de 60% dos casos. Lemanske *et al* (2005) afirma que é comum o *Rhinovírus* predominar no terceiro ano de vida levando a chiado recorrente. Alguns estudos afirmam que vários episódios de infecções respiratórias podem ser a causa de chiados recorrentes, já que essas infecções repetidas, devido ao processo inflamatório causado pelas mesmas, lesam a mucosa respiratória (Folkerts & Nijkamp, 1995; Fonseca *et al*; 2003). Nossos achados confirmaram a importância do vírus em associação com episódios de chiado em crianças, anteriormente relatado por muitos autores (Johnston, 1999; Douglas *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2003).

No Brasil, um estudo investigou infecções virais como fator de risco para chiado agudo em crianças com idade entre 0-12 anos e reportou que o HRV não estava associado com chiado agudo e exacerbações de asma. Os pesquisadores acreditam que esses resultados talvez estejam atribuídos a diferentes respostas imunológicas para HRV na população asmática brasileira comparada com outras populações estudadas. Eles sugerem ainda que os sorotipos de HRV que está circulando em países tropicais possam ser diferentes daqueles de clima temperados (Camara *et al.*, 2004).

O HRV tem mostrado ser o maior grupo de vírus causadores de infecções respiratórias leves, por exemplo, o resfriado comum (Brownlee & Turner, 2008).

Apesar da importância econômica e médica do HRV, pouco é conhecido sobre a circulação e o relativo impacto de cada um dos sorotipos.

A duração dos sintomas de infecções respiratórias em geral no nosso estudo foi longa, sendo a média mínima de 15,58 e máxima de 26,28 (média/dias). Quando observamos a duração dos sintomas para *Rhinovírus*, variou de 5 a 74 dias. Miller *et al* (2007), realizaram um estudo por um período de um ano com crianças hospitalizadas e observaram que em crianças com casos confirmados de infecção por *Rhinovírus*, a média de duração dos sintomas foram 3 dias (variando de 1-22 dias), e a mesma para os outros vírus estudados (variando de 1-71 dias). Em outro estudo, que teve duração de 3 anos e acompanhou crianças durante o seu primeiro ano de vida, a duração média dos sintomas durante uma infecção foi de 9.5 dias (van der Zalm *et al.*, 2009). A pesquisa realizada por Hayden *et al* (2003) afirmou que a média de duração dos sintomas de HRV em sua pesqui-

Discussão

sa foi de 7 dias, entretanto, em alguns pacientes, pode chegar a 2 semanas. O estudo de van der Zalm *et al.* (2009), mostrou que apesar do RSV ser considerado um vírus mais agressivo que o HRV, geralmente causando sintomas mais severos nas suas infecções, quando foi comparada a duração desses sintomas com a duração dos sintomas causados por *Rhinovírus* ficou evidente que a duração dos sintomas de RSV foi bem menor, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0.03$).

Durante o período de estudo, observamos vários casos de infecções repetidas (29%). Dessas amostras 82% foram re-infecções de *Rhinovírus*. Estes resultados estão de acordo com Jartti *et al* (2008) que diz que infecções recorrentes de *Rhinovírus* são comuns e que não são resultado de uma infecção crônica ou persistente, mas sim de re-infecções com diferentes sorotipos. Pelo fato de ser caracterizado mais de 100 sorotipos e a maioria deles estar circulando na comunidade, re-infecções são esperadas ocorrer por toda vida. Como pode ser observada, a recorrência de infecções respiratórias foi elevada, indicando a importância da realização de controles epidemiológicos em ambientes fechados como escolas e creches.

Com relação às tendências sazonais da ocorrência de infecções respiratórias virais nas crianças da creche, notou-se que em 2004 as infecções compreenderam o período de junho a novembro, com picos em agosto e novembro de HRV. Em 2005, as infecções ocorreram entre os meses de fevereiro e setembro, com pico em maio de HRV. Nos meses do dezembro e fevereiro (Janeiro não foi coletado amostra), as infecções reduziram pelo fato de ser período de férias nas creches da cidade, ocorrendo assim um menor contato entre as

Discussão

crianças e possivelmente uma redução da transmissão dos patógenos, o que pode ter influenciado na redução de vírus respiratórios nesses 2 meses. Vale ressaltar que a região de São José do Rio Preto, possui um clima subtropical, caracterizado por baixa umidade do ar com temperaturas moderadamente baixas e verões chuvosos. Além disso, é conhecido que a circulação de vírus respiratórios mostra padrões diferentes, de acordo com cada região (Costa *et al.*, 2006). Em um estudo realizado na Amazônia, foi observado que as internações por doenças respiratórias apresentam redução nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro, o que está de acordo com nossos resultados. Há aumento dos casos de internação por doenças respiratórias no mês de março e nos meses de seca extrema (julho, agosto e setembro) (Rosa *et al.*, 2008).

Existem evidências de que a prática da queima da cana no período da seca aumenta as concentrações de gases e partículas de aerossol na atmosfera. Estudo realizado em Cuiabá, capital do estado de Mato Grosso, mostrou maior proporção de internações por doenças respiratórias no período da seca, quando há maior número de queimadas naquela região (Souza *et al.*, 2009). É importante ressaltar que a região de São José do Rio Preto é rica em plantações de cana-de-açúcar e a queima dessa cana pode ser um fator agravante para o aumento de infecções respiratórias nesse período de seca intensa na região. Observando a sazonalidade dos vírus respiratórios analisados em nosso estudo, fica claro que o *Rhinovírus* foi detectado durante todo o período de estudo, o que está de acordo com Van Der Zalm *et al.* (2009), que também encontrou infecções por HRV durante todo o ano.

Discussão

Em Salvador, Souza *et al.* (2003) detectou *Rhinovírus* com maior frequência durante os meses de outono, mas ocorreram em todo o período de estudo, indicando uma menor frequência apenas em novembro e dezembro.

Analizamos ainda a distribuição das infecções de *Rhinovírus* por estações do ano, e observamos a presença de HRV no outono, inverno e primavera. No verão, foi observado apenas um caso de infecção de *Rhinovírus*. Porém, nenhuma associação significativa foi estabelecida ($p=0.81$). Em um estudo indiano, o *Rhinovírus* também não apresentou associação com nenhuma estação em particular ($p=0.867$) (Matthew *et al.*, 2009).

CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que:

1. Os vírus respiratórios que circulam na creche “Maria Inês Arnal” em São José do Rio Preto são: *Vírus Sincicial Respiratório* (7,9%), *Influenza A* (2,6%), *Vírus Parainfluenza* do tipo 1 (2,6%) e *Vírus Parainfluenza* do tipo 2 (1,3%), *Metapneumovírus Humano* (1,3%), *Enterovírus Humano* (7,9%) e *Rhinovírus Humano* (76,3%).
2. De todos os vírus detectados em nosso estudo, o *Rhinovírus Humano* foi o vírus respiratório predominante nas infecções respiratórias da população de creche (76,3%).
3. As infecções respiratórias foram mais frequentes em crianças que apresentavam idade entre 1 e 3 anos, e esses casos foram diminuindo de acordo com o aumento da idade. Além disso, crianças do sexo masculino foram mais acometidas por vírus respiratórios do que crianças do sexo feminino.
4. Os sintomas apresentados pelas crianças foram moderados, sendo coriza e tosse os mais comuns manifestados por elas.

5. O *Rhinovírus* foi pouco detectado no verão, porém na primavera, outono e inverno esse vírus foi o mais encontrado nas amostras de crianças com infecção respiratória aguda frequentadoras da creche “Maria Inês Arnal” em São José do Rio Preto, SP.

REFERÊNCIAS

Referências

- ALONSO, W. J. et al. Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the Amazon to the subtropics. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 165, n. 12, p. 1434-1442, 2007.
- ARDEN, K. E. et al. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 78, n. 9, p. 1232-1240, 2006.
- ARRUDA, E. et al. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 164, n. 2, p. 252-258, 1991.
- _____; HAYDEN, F. G. Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 7, n. 5, p. 373-379, 1993.
- BACHEGA, M. I.; ZULIANI, A. Estudo retrospectivo das infecções das vias aéreas superiores em crianças de 4 a 12 meses que freqüentaram o berçário e maternal “Leite & Amor”, USP, Bauru. **Pediatria Moderna**, São Paulo, v. 35, n. 12, p. 948-958, 1999.
- BELSHE, R. B.; MURPHY, B. R.; WESTER, R. G. Orthomyxoviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Virology**. 3. ed. New York: Lippincott-Raven, 1996. p. 1397-1445.
- BLIZZARD, L. et al. Parental smoking and infant respiratory infection: how important is not smoking in the same room with the baby? **American Journal of Public Health**, Washington, v. 93, n. 3, p. 482-488, 2003.
- BOIVIN, G. et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 9, p. 1330-1440, 2002.
- BONFANTI, J. F.; ROYMANS, D. Prospects for the development of fusion inhibitors to treat human respiratory Syncytial Infection. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, London, v. 12, n. 4, p. 479-487, 2009.

BRANKSTON, G. et al. Transmission of influenza A in human beings. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 7, n. 4, p. 257-265, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Datasus. **Informações de saúde**. 2000. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/mortinf/mibr.htm>>. Acesso em: 23 maio 2009.

_____. Instituto Evandro Chagas. **Estudo da etiologia viral em casos de infecção respiratória aguda (IRA) na Amazônia**. Disponível em: <<http://www.iec.pa.gov.br/pibic/res2006-25.htm>>. Acesso em: 24 jun. 2009.

BROWNLEE, J. W.; TURNER, R. B. New developments in the epidemiology and clinical spectrum of rhinovirus infections. **Current Opinion in Pediatrics**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 67-71, 2008.

BUENO CAMPAÑA, M.; CALVO, R. C.; VÁZQUEZ, A. M. C. Viral respiratory tract infections in the first six months of life. **Anales de Pediatría**, Barcelona, v. 69, n. 5, p. 400-405, 2008.

BULKOW, L. R. et al. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection among Alaska native children. **Pediatrics**, Evanston, v. 109, n. 2, p. 210-216, 2002.

CAMARA, A. A. et al. Risk factors for wheezing in a subtropical environment: role of respiratory viruses and allergen sensitization. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 113, n. 3, p. 551-557, 2004.

CARDOZO, S. E. et al. Risk factors for acute respiratory disease hospitalization in children under one year of age. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 351-358, 2007.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recommendations and Reports**, Atlanta, v. 53, n. RR6, p. 1-40, 2004.

CHAN, P. K. et al. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 9, p. 1058-1063, 2003.

CHARLTON, A. Children and passive smoking: a review. **Journal of Family Practice**, New York, v. 38, n. 3, p. 267-277, 1994.

CHERRY, J. D. Adenovirus. In: FEIGIN, R. D.; CHERRY, J. D.; DEMMLER, G. J. (Ed.). **Textbook of pediatric infectious diseases**. Philadelphia: Elsevier, 2004. v. 2, p. 1843-1862.

CLAAS, E. C. et al. Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 39, n. 1-2, p. 1-13, 1992.

COELHO, M. C. et al. Impact of respiratory infections by influenza viruses A and B in pediatrics patients from Federal University of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 2, p. 220-223, 2007.

COSTA, L. F. **Vírus respiratórios em crianças menores de cinco anos de idade, com doença respiratória aguda, em Uberlândia, MG, no período de 2001 a 2004**. 56 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

CROWCROFT, N. S. et al. Respiratory syncytial virus infection in infants admitted to paediatric intensive care units in London, and in their families. **European Journal of Pediatrics**, Heidelberg, v. 167, p. 395-399, 2007.

CROWE, J. E. et al. Human metapneumovirus as a major cause of human respiratory tract disease. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 23, n. 11, p. 215-221, 2004.

CUEVAS, L. E. et al. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 12, p. 1626-1628, 2003.

DAMLE, R. G. et al. Respiratory viruses in acute respiratory tract infections in western Índia. **Indian Journal of Pediatrics**, Calcuttá, v. 75, n. 4, p. 341-345, 2008.

D'ELIA, C. et al. Respiratory syncytial vírus – associated lower respiratory tract infections in hospitalized infants. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, DF, v. 38, n. 1, p. 7-10, 2005.

DE PALMA, A. M. et al. Selective inhibitors of picornavirus replication. **Medicinal Research Reviews**, New York, v. 28, n. 6, p. 823-884, 2008.

DOUGLASS, J. A.; O'HEHIR, R. E. What determines asthma phenotype? Respiratory infections and asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 161, n. 3, p. 211-214, 2000.

DRESCHERS, S.; DUMITRU, C. A.; ADAMS, C. The cold case: are rhinoviruses perfectly adapted pathogens? **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 64, n. 2, p. 181-191, 2007.

ECHEVARRÍA, J. E. et al. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 5, p. 1388-1391, 1998.

ESTRADA, B. et al. Human metapneumovirus infection. **Clinical Pediatrics**, Philadelphia, v. 46, n. 3, p. 258-262, 2007.

FABBIANI, M. et al. Epidemiological and clinical study of viral respiratory tract infections in children from Italy. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 81, n. 4, p. 750-756, 2009.

FALSEY, A. R. et al. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 187, n. 5, p. 785-790, 2003.

_____. et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high risk adults. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 352, n. 17, p. 1749-1759, 2005.

_____; WALSH, E. E. Viral pneumonia in older adults. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 518-524, 2006.

FITERMAN, J.; CHATKIN, J. M.; CHATKIN, M. **Epidemiologia das infecções respiratórias agudas (IRAs)**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p. 90-103.

FLEMING, D. M.; CROSS, K.W. Respiratory syncytial virus or influenza? **Lancet**, London, v. 25, n. 342, p. 1507-1510, 1993.

FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F. P. Virus-induced airway hyperresponsiveness - role of inflammatory cells and mediators. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 151, n. 5, p. 1666-1674, 1995.

FONSECA, C. et al. Bronchiolitis, respiratory syncytial virus, and recurrent wheezing: what is the relationship? **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 39-48, 2003.

FOUCHIER, R. A. et al. Newer respiratory virus infections: human metapneumovirus, avian influenza virus, and human coronaviruses. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 18, n. 2, p. 141-146, 2005.

FOULONGNE, V.; RODIERE, M.; SEGONDY, M. Human bocavirus in children. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 5, p. 862-863, 2006.

FRANCA, E. et al. Association between socioeconomic factors and infant deaths due to diarrhea, pneumonia, and malnutrition in a metropolitan area of Southeast Brazil: a case-control study. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 1437-1447, 2001.

GARCÍA, M. L. et al. Infecciones respiratorias por metapneumovirus en lactantes hospitalizados. **Anales de Pediatría**, Barcelona, v. 61, n. 3, p. 213-218, 2004.

GE, Q.; EISEN, H. N.; CHEN, J. Use of siRNAs to prevent and treat influenza virus infection. **Virus Research**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 37-42, 2004.

GRONDAHL, B. et al. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 1, p. 1-7, 1999.

HAYDEN, F. G. et al. Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults: Results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 36, n. 12, p. 1523-1532, 2003.

HOOGEN, B. G. et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nature Medicine**, New York, v. 7, n. 6, p. 719-724, 2002.

HOOGEN, V. D. et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 188, n. 10, p. 1571-1577, 2003.

HUESTON, W. J. Antibiotics for upper respiratory tract infections. **Archives of Family Medicine**, Chicago, v. 8, n. 5, p. 426-430, 1999.

ISHIGURO, N. et al. Early reinfection with human metapneumovirus in an infant. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 12, p. 5944-5946, 2004.

IWANE, M. K. et al. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses among young children. **Pediatrics**, Evanston, v. 113, n. 6, p. 1758-1764, 2004.

JACQUES, J. et al. Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 35, n. 4, p. 463-466, 2006.

JARTTI, T. et al. Serial viral infections in infants with recurrent respiratory illnesses. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 32, n. 2, p. 314-320, 2008.

JINOT, J.; BAYARD, S. Respiratory health effects of passive smoking: EPA's weight-of-evidence analysis. **Journal of Clinical Epidemiology**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 339-349, 1994.

JOHNSTON, S. L. The role of viral and atypical bacterial pathogens in asthma pathogenesis. **Pediatric Pulmonology—Supplement**, New York, v. 18, p. 141-143, 1999.

KAMPS, B. S.; HOFFMANN, C.; PREISER, W. **Influenza report 2006 (internet)**, Paris, Flying Publisher, p. 225, 2006.

KESSON, A. M. Respiratory virus infections. **Paediatric Respiratory Reviews**, London, v. 8, n. 3, p. 240-248, 2007.

KISTLER, A. et al. Pan-viral screening of respiratory tract infections in adults with and without asthma reveals unexpected human coronavirus and human rhinovirus diversity. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 196, n. 6, p. 817-825, 2007.

KOCH, A. et al. Risk factors for acute respiratory tract infections in young Greenlandic children. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 158, n. 4, p. 374-384, 2003.

LAMSON, D. et al. MassTag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004–2005. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 194, n. 10, p. 1398-1402, 2006.

LAU, S. K. et al. Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 11, p. 3655-3664, 2007.

LEDFORD, R. M. et al. VP1 sequencing of all human rhinovirus serotypes: insights into genus phylogeny and susceptibility to antiviral capsid-binding compounds. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 7, p. 3663-3674, 2004.

LEE, W. M. et al. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 2, n. 10, e. 966, 2007.

LEMANSKE, R. F. et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 116, n. 3, p. 571-577, 2005.

LOSCERTALES, M. P. et al. Epidemiology and clinical presentation of respiratory syncytial virus infection in a rural área of Southern Mozambique. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 21, n. 2, p. 148-155, 2002.

MACEDO, S. E. C. et al. Fatores de risco para internação por doença respiratória aguda em crianças até uma no de idade. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 351-358, 2007.

McERLEAN, P. et al. Characterisation of a newly identified human rhinovirus, HRV-QPM, discovered in infants with bronchiolitis. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v. 39, n. 2, p. 67-75, 2007.

_____. et al. Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, human rhinovirus C (HRV C). **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, n. 4, e1847, 2008.

MACKIE, P. L. The classification of viruses infecting the respiratory tract. **Paediatric Respiratory Reviews**, London, v. 4, n. 2, p. 84-90, 2003.

MANOHA, C. et al. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 221-226, 2007.

MATTHEW, J. et al. Distribution and seasonality of rhinovirus and other respiratory viruses in a cross-section of asthmatic children in Trinidad, West Indies. **Italian Journal of Pediatrics**, London, v. 35, p. 16, 2009.

MAZZONCINI JÚNIOR, J. P.; CROWELL, C. B.; KANG, C. S. Human metapneumovirus: An emerging respiratory pathogen. **Journal of Emergency Medicine**, New York, 2008. No prelo.

MAZZULLI, W. T. et al. Molecular characterization of a nosocomial outbreak of human respiratory syncytial virus on an adult leukemia/lymphoma. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 180, n. 5, p. 1686-1689, 1999.

MEJÍAS, A.; CHÁVEZ-BUENO, S.; RAMILO, O. Human metapneumovirus: a not so new virus. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 23, n. 1, p. 1-7, 2004.

MILLER, E. K. et al. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 195, n. 6, p. 773-781, 2007.

MONTO, A. S. Epidemiology of viral respiratory infections. **American Journal of Medicine**, New York, v. 112, n. 6A, p. 4-12, 2002.

NASCIMENTO, J. P. et al. Longitudinal study of acute respiratory disease in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 33, p. 287-296, 1991.

NASCIMENTO-CARVALHO, C. M. et al. Childhood pneumonia: clinical aspects associated with hospitalization or death. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 6, n. 1, p. 22-28, 2002.

NELSON, M. I. et al. Phylogenetic analysis reveals the global migration of seasonal influenza A viruses. **PloS Pathogens**, San Francisco, v. 3, n. 9, p. 1220-1228, 2007.

NEWMAN, J. T. et al. Sequence analysis of the Washington/1964 strain of human parainfluenza virus type 1 (HPIV1) and recovery and characterization of wild-type recombinant HPIV1 produced by reverse genetics. **Virus Genes**, Boston, v. 24, n. 1, p. 77-92, 2002.

NICHOLSON, K. G. et al. Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: comparative, prospective population based study of disease burden. **British Medical Journal**, London, v. 315, n. 7115, p. 1060-1064, 1997.

OGRA, P. L. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. **Pediatric Respiratory Reviews**, London, v. 5, p. S119-126, 2004. Supplement A.

OMER, S. B. et al. Climatic, temporal, and geographic characteristics of respiratory syncytial virus disease in a tropical island population. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 136, n. 10, p. 1319-1327, 2008.

ORDÁS, J. et al. Role of metapneumovirus in viral respiratory infections in young children. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 8, p. 2739-2742, 2006.

PARODY, R. et al. Upper and lower respiratory tract infections by human enterovirus and rhinovirus in adult patients with hematological malignancies. **American Journal of Hematology**, New York, v. 82, n. 9, p. 807-811, 2007.

PECCHINI, R. et al. Incidence and clinical characteristics of the infection by the respiratory syncytial virus in children admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 12, n. 6, p. 476-479, 2008.

PEIRIS, J. S. et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 6, p. 628-633, 2003.

PELTOLA, V.; RUUSKANEN, O. Respiratory viral infections in developing countries: common, severe, and unrecognized. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 46, n. 1, p. 58-60, 2008.

_____. et al. Rhinovirus transmission within families with children: incidence of symptomatic and asymptomatic infections. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 197, n. 3, p. 382-389, 2008.

PERET, T. C. T. et al. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. **Journal of General Virology**, London, v. 79, p. 2221-2229, 1998.

POST, C. L. et al. Fatores prognósticos de letalidade hospitalar por diarreia ou pneumonia em menores de um ano de idade. Estudo de caso e controle. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 369-378, 1992.

PRIETSCH, S. O. et al. Doença aguda das vias aéreas inferiores em menores de cinco anos: influência do ambiente doméstico e do tabagismo materno. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 5, p. 415-422, 2002.

QUACH, C. et al. Risk factors with severe influenza infections in childhood. Implication for vaccine strategy. **Pediatrics**, Evanston, v. 112, n. 3, p. 197-201, 2003.

REGAMEY, N.; KAISER, L. Rhinovirus infections in infants: is respiratory syncytial virus ready for the challenge? **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 32, n. 2, p. 314-320, 2008.

REINA, J. et al. Características clínicas y epidemiológicas de las infecciones respiratorias causadas por el metapneumovirus humano en pacientes pediátricos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 26, n. 2, p. 72-76, 2008.

ROSA, A. M. et al. Análise das internações por doenças respiratórias em Tangará da Serra - Amazônia Brasileira. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 34, n. 8, p. 575-582, 2008.

RUOHOLA, A.; HEIKKINEN T.; WARIS M. Intranasal fluticasone propionate does not prevent acute otitis media during viral upper respiratory infection in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 106, n. 3, p. 467-471, 2000.

SCHMITT, H. J. et al. The beginning of a new era: systematic testing for pathogens causing acute respiratory tract infections (ARI) in children. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 5, p. 391-396, 2007.

SELWYN, B. J. The epidemiology of acute respiratory tract infections in young children: comparison of findings from several developing countries. Coordinated Data Group of BOSTID researchers. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 12, n. 8, p. 870-888, 1990.

SHEK, L. P. C.; LEE, B. W. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. **Paediatric Respiratory Reviews**, London, v. 4, n. 2, p. 105-111, 2003.

SMITH, T. J. et al. The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. **Science**, Washington, v. 233, n. 4770, p. 1286-1293, 1986.

SOUZA, L. S. F. et al. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban northeast Brazil. **Pediatric Pulmology**, Philadelphia, v. 35, n. 3, p. 184-191, 2003.

SOUZA, R. R. et al. Doenças e óbitos do aparelho respiratório ocorridos na cidade de Cuiabá, MT no ano de 2007. In: SIMPÓSIO REGIONAL DE GEOGRAFIA: a geografia no centro-oeste brasileiro: passado, presente e futuro, 11., 2009, Jataí. **Anais...** Jataí: UFG, 2009.

STENSBALLE, L. G.; DEVASUNDARAM, J. K.; SIMOES, E. A. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 22, n. 2, p. 21-32, 2003.

TANG, R. S. et al. Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 20, p. 10819-10828, 2003.

TELLES FILHO, P. A. **Asma brônquica: infecção viral e asma**. 1997. Disponível em: <http://www.asmabronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_infeccao_viral.html>. Acesso em: 30 maio 2009.

THOMAZELLI, L. M. et al. Vigilância de oito vírus respiratórios em amostras clínicas de pacientes pediátricos no sudeste do Brasil. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 5, p. 422-428, 2007.

TSAI, H. P. et al. Respiratory viral infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 1, p. 111-118, 2001.

UHARI, M.; MÖTTÖNEN, M. An open randomized controlled trial of infection prevention in child day-care centers. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 18, n. 8, p. 672-677, 1999.

VAN DER ZALM, M. et al. Respiratory pathogens in respiratory tract illnesses during the first year of life: a birth cohort study. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 28, n. 6, p. 472-476, 2009.

VASQUEZ, M.; MOSQUERA, M. Incidência e fatores de risco de diarreia e infecções respiratórias agudas em comunidades urbanas de Pernambuco, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 163-171, 1999.

VICENTE, D. et al. Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 5, p. 602-603, 2003.

VICTORA, C. G.; BARROS, F. C.; VAUGHAN, J. P. **Epidemiologia da desigualdade: um estudo longitudinal de 6.000 crianças brasileiras**. 2. ed. São Paulo: Hucitec, 1988.

_____. **Factores de riesgo en las IRA bajas. Infecciones respiratorias en niños**. Washington: OPAS, p. 45-63, 1996.

_____. et al. Risk factors for pneumonia among children in a Brazilian metropolitan area. **Pediatrics**, Evanston, v. 93, n. 6, p. 977-985, 1994.

WALSH, E. E.; GRAHAM, B. S. Respiratory syncytial viruses. In: DOLIN, R.; WRIGHT, P. F. (Eds.). **Viral infections of the respiratory tract**. New York: Marcel Dekker, 1999. v. 127, cap. 7, p. 161-204.

WILLIAMS, J. V. Human metapneumovirus: an important cause of respiratory disease in children and adults. **Current Infectious Disease Reports**, Philadelphia, v. 7, n. 3, p. 204-210, 2005.

WYDE, P. R. et al. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 51-59, 2003.

WOLF, D. G. et al. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized Young children. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 25, n. 4, p. 320-324, 2006.

YANG, E.; RUBIN, B.K. "Childhood" viruses as a cause of pneumonia in adults. **Seminars in Respiratory Infections**, Orlando, v. 10, n. 4, p. 232-243, 1995.

YEOLEKAR, L. R. et al. Respiratory viruses in acute respiratory tract infections in western India. **Indian Journal of Pediatrics**, Calcuttá, v. 75, n. 4, p. 341-345, 2008.

ZAMORANO, A. et al. Association of acute bronchiolitis with climate factors and environmental contamination. **Revista Médica de Chile**, Santiago del Chile, v. 131, n. 10, p. 1117-1122, 2003.