

José Augusto Ramos Medeiros

Vigilância de vírus respiratórios, com ênfase para o
Vírus Respiratório Sincicial e Metapneumovírus
Humano em crianças atendidas no Hospital das
Clínicas da FMB, UNESP - Campus de Botucatu -
SP

Botucatu – SP
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Medicina de Botucatu

Campus de Rubião Junior

Vigilância de vírus respiratórios, com ênfase para o Vírus Respiratório Sincicial e Metapneumovírus Humano em crianças atendidas no Hospital das Clínicas da FMB, UNESP - Campus de Botucatu - SP

José Augusto Ramos Medeiros

Orientador: João Manuel Grisi Candeias

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

Botucatu – SP

2011

Dedicatória

*Dedico este trabalho a meus
pais que me apoiaram desde o início
para realização deste trabalho.*

Agradeço

Ao professor João Candeias que me orientou e possibilitou a realização desse trabalho.

Aos professores João Pessoa Araujo; Adriana Polachini do Valle; e Vera Lúcia Mores Rall que muito colaboraram para melhoria desse trabalho em defesas de qualificação.

Ao professor Eduardo Bagagli que gentilmente consentiu o uso do microscópio de imunofluorescência.

Aos zelosos funcionários do departamento Sonia Maria Faraldo; Luiz Severino dos Santos; Luiz Henrique Alquati por toda ajuda prestada.

Aos colegas de laboratório: Thais Fukuta; Lidiane; Aripuanã Watanabe; Flavio; Thiago Neves; Flavio; Andreza.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.2 Doenças do trato respiratório inferior	3
1.3. Principais vírus respiratórios.....	7
1.4.Diagnóstico virológico	13
2. Objetivos.....	18
3. Casuística e Métodos	19
3.1. Pacientes e espécimes clínicos:.....	19
3.2. Processamento das amostras	19
3.3. Diagnóstico por imunofluorescência Indireta	20
3.4. Diagnóstico por RT-PCR para RSV	22
3.4.1 Primers escolhidos para RSV	22
3.4.2.Extração do RNA.....	23
3.4.3.Transcrição reversa	23
3.4.4.Amplificação do RSV	24
3.4.5.Análise dos produtos amplificados.....	24
3.5. Diagnóstico por RT-PCR para HMPV.....	25
3.5.1.Primers escolhidos para HMPV.....	25
3.5.2.Extração do RNA.....	25
3.5.3.Transcrição reversa	25
3.5.4.Amplificação do hMPV.....	25
3.4.6.Análise dos produtos amplificados.....	26
3.6. Análise estatística.....	26
3.6. Parâmetros clínicos	26

4. Resultados.....	27
4.1. Imunofluorescência Indireta.....	27
4.2. Detecção de RSV por PCR	28
4.3. Detecção de hMPV por PCR	29
4.4. Comparação entre as técnicas de imunofluorescência e PCR para detecção de RSV.....	30
4.5. Prevalência viral no período de março de 2005 a junho de 2006	31
4.6. Dados Clínicos	35
5. Discussão	36
6. Conclusões.....	47
7. Referências	48

Lista de Figuras

Figura 1: O sistema respiratório.....	1
Figura 2: Representação da aplicação das amostras nas lâminas.....	22
Figura 3: Teste de Imunofluorescência para detecção do vírus respiratório sincicial (RSV) por detecção indireta.....	27
Figura 4: Total das amostras positivas por imunofluorescência, de março de 2005 a junho de 2006.	27
Figura 5: Distribuição total das amostras positivas por PCR para hMPV e RSV, de março de 2005 a junho de 2006.....	27
Figura 6: Gel de eletroforese para detecção de HMPV..	27
Figura 7: Distribuição total das amostras positivas por imunofluorescência para parainfluenza 1; 2; e 3 no período de março de 2005 a junho de 2006.....	27
Figura 8: Distribuição total das amostras positivas por imunofluorescência para influenza A; influenza B; e adenovírus no período de março de 2005 a junho de 2006..	27
Figura 9: Distribuição total das amostras positivas por PCR para RSV e hMPV no período de março de 2005 a junho de 2006.....	27

Lista de Tabelas

Quadro 1: principais doenças do sistema respiratório com suas características mais evidentes, principais agentes causadores e tratamento disponível. 6

Quadro 2: principais vírus respiratórios com suas famílias, principais doenças associadas e droga disponível para seu controle 13

Tabela 1: Tabela comparativa das técnicas de PCR (PCR+/PCR-) e de imunofluorescência indireta (IF+/IF-). 27

Tabela 2: Parâmetros clínicos encontradas, separadas por vírus encontrados. Onde HMPV=Somente Metapneumovírus humano, RSV= Somente Vírus respiratório sincicial, Coinfecção= Metapneumovírus humano e Vírus respiratório sincicial e Negativo= nenhum dos dois vírus. 35

1. Introdução

Com a função de trocas gasosas o trato respiratório humano possui uma área de quase 140 m², combinada com uma ventilação de 6 litros por minuto, o que faz dele uma das rotas mais comuns de entrada de microorganismos, patogênicos ou não, em nosso organismo. Esse sistema possui um amplo aparato defensivo como: cílios, movimentos ciliares, muco, tosse, fagócitos, tecido linfóides em posições estratégicas, agentes antimicrobianos e defencinas (Flint et al, 2000; Tortora et al, 2005). Assim, infecções respiratórias agudas representam 30 a 40% de todas as consultas pediátricas, 20 a 40% de todas as internações de crianças e cerca de 20% das mortes de crianças no mundo em desenvolvimento (WHO, 2009 Cashat-Cruz et al, 2005). Dessas mortes, 90% são diagnosticadas como pneumonia. Ainda assim, pesquisas relacionadas à doenças respiratórias agudas do trato respiratório inferior recebe cerca de US\$0.51 por dia, enquanto pesquisas relacionadas à AIDS, asma, doenças reumáticas recebem: US\$85.00; US\$13.00 e US\$10.00 respectivamente (International Conference on Acute Respiratory Infections, 1997). Os principais organismos causadores são bactérias (*Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*) e vírus. Infelizmente não é possível diferenciar um ou outro apenas pelos sinais clínicos ou radiografias. Vale ressaltar que vírus são isolados e identificados em menos de 1% dos casos de infecções pneumônicas. Sendo assim, torna-se claro, que o rápido conhecimento do agente infeccioso e o tratamento adequado pode ser fundamental na redução da mortalidade. Dentre os mais importantes vírus reconhecidos nas infecções respiratórias agudas estão o vírus sincicial respiratório (RSV), o vírus influenza, parainfluenza, metapneumovírus, coronavírus e os adenovírus (WHO, 2009).

Por convenção o trato respiratório é separado em: trato respiratório superior (composto de seios paranasais, cavidade nasal, nasofaringe, orofaringe, epiglote e laringe) e trato respiratório inferior (composto de traquéia, brônquios, bronquíolos, alvéolos e pulmões).

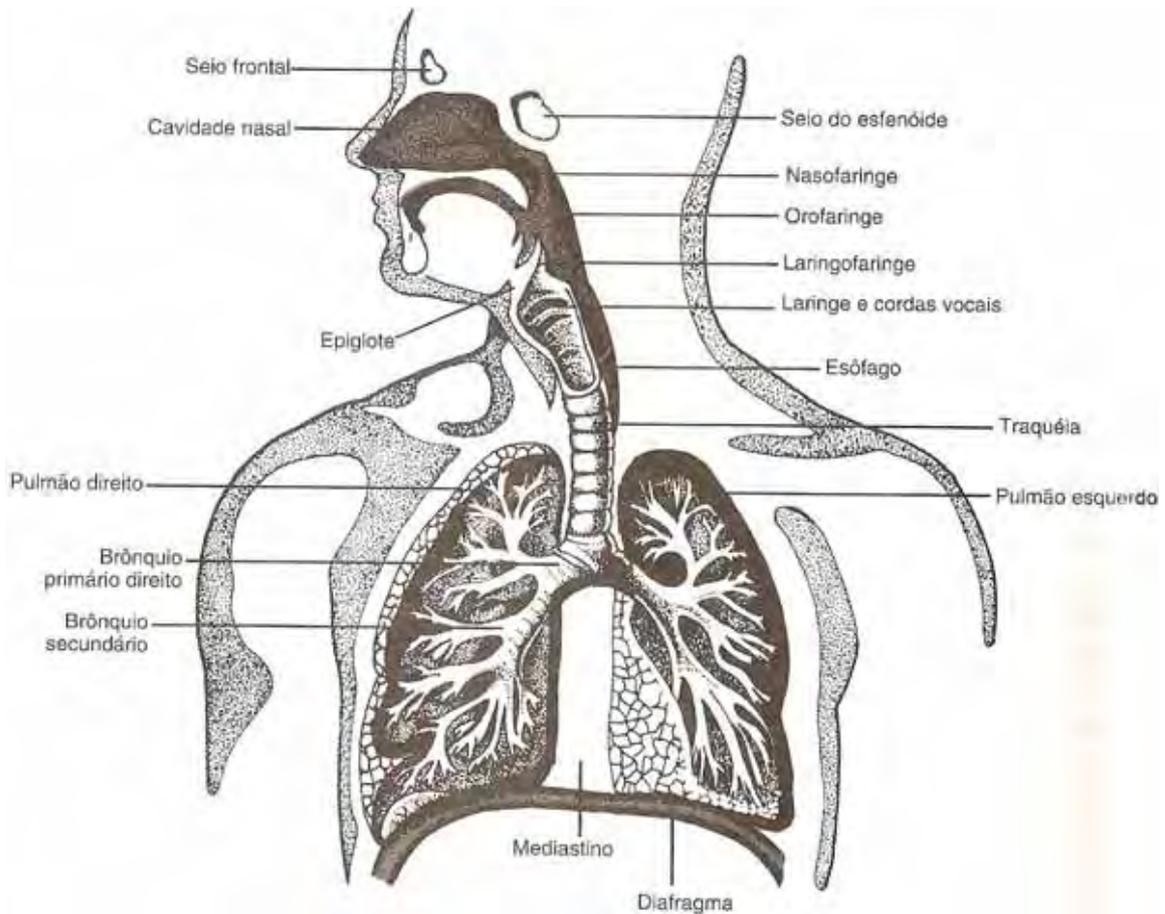


Figura 1: O sistema respiratório. (Extraído de Burton GEW, Engelkirk PG. Principais Doenças Infecciosas Humanas. In: Burton GEW, Engelkirk PG, autores. Microbiologia para as Ciências da Saúde. 5ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Editora Guanabara Koogan S.A.; 1998. p.220.)

1.1 Doenças do trato respiratório superior

O Resfriado Comum é uma das doenças mais frequentes no homem, em todas as faixas etárias. Suas características são: coriza (secreção intensa das narinas), espirro e dor de garganta. Em casos mais graves pode haver: bronquiolite, bronquite e infecções bacterianas secundárias resultando em sinusite (inflamação de um ou mais seios paranasais) e otite média (inflamação do ouvido médio). Em aproximadamente 50% dos casos o agente etiológico é o

rinovírus, outros agentes podem ser o coronavírus; RSV e parainfluenza. Sua transmissão se dá por contato direto e o período de incubação é de 1 a 3 dias. Essa doença é mais comum no outono e primavera e acomete mais crianças que adultos. O tratamento para a maioria dos casos é repouso, reposição de líquidos e alívio de sintomas (Tortora et al, 2005; Burton et al, 1998).

O Crupe ou Laringotraqueíte aguda é uma doença que apresenta inchaço subglótica e chiado. Normalmente causada pelos vírus: parainfluenza, RSV, influenza, além do *Mycoplasma pneumoniae*. Seu contágio é direto e apresenta incubação variável. Sua cura é espontânea e o tratamento usual é o uso de vaporizadores e o antiviral amantadina (Tortora et al, 2005; Burton et al, 1998).

Há outras doenças do trato respiratório superior, com etiologia, geralmente, bacteriana e eventualmente após uma infecção viral. Doenças como: Difteria que é uma doença bacteriana aguda que acomete a tonsila e, apesar da vacinação, ainda é um problema em regiões mais pobres do Brasil e do mundo. (Tortora et al, 2005; Burton et al, 1998); Faringite (dor de garganta); epiglotite; tonsilite; sinusite; difteria; otite média (Tortora et al, 2005; Burton et al, 1998).

1.2 Doenças do trato respiratório inferior

A Pneumonia é uma infecção aguda dos alvéolos e dos tecidos do pulmão. Pode apresentar febre, tosse, dor aguda no peito, calafrios e falta de ar. É diagnosticada por semiologia pulmonar ou radiografia do tórax. Não raro, a pneumonia viral pode ser agravada por invasão bacteriana. Ela pode ser causada por bactérias gram-negativas, gram-positivas, micoplasmas, clamídias, vírus e fungos, porém tem sido mais comumente associada ao *Streptococcus pneumoniae*. Sua transmissão se dá por contágio direto e com período de incubação dependente do agente causador. Anualmente 3 milhões de crianças morrem por essa doença (19% de todas as mortes de crianças com até cinco anos de idade), principalmente em nações mais pobres. Deste modo, o tratamento vai depender da identificação do patógeno através do escarro ou outras amostras do

trato respiratório inferior (Tortora et al, 2005; Burton et al, 1998; Cashat-Cruz M et al., 2005; International Conference on Acute Respiratory Infections, 1997).

A Gripe é uma infecção viral específica aguda com febre, calafrios, dor de cabeça, tosse, secreção nasal, algumas vezes causando bronquite, pneumonia e morte. Em crianças pode haver náuseas, vômito e diarreia. Os agentes causadores são os vírus influenza A, B e C. Sua transmissão é de forma direta com período de incubação de 1 a 3 dias. Atualmente ela acomete 10% da população mundial durante o inverno, e cerca de 50% de crianças em idade escolar, com taxa de mortalidade de menos 1%. Normalmente o vírus influenza infecta sozinho e desse modo comumente não é fatal. Amantadina, Rimantadina, Zanamivir e Oseltamivir são drogas antivirais contra o influenza A, porém, de modo geral, somente os sintomas da doença são tratados. As linhagens virais são identificadas pela variação nos antígenos H e N. As diferentes formas de antígenos recebem números. Cada mudança de número representa uma alteração substancial na composição protéica da espícula. Essas alterações são denominadas flutuações antigênicas e são grande o suficiente para que haja evasão do sistema imune de maior parte da humanidade. Essa habilidade é a responsável pela maioria dos surtos e pandemias. Mas entre episódios de flutuações antigênicas existem pequenas variações chamadas desvios antigênicos. O resultado desse desvio é que a imunidade contra esse vírus tende a ser menos eficiente. Assim esses dois fatores tornam impossíveis o desenvolvimento de uma vacina que forneça imunidade prolongada à população. Para uma imunização eficiente da população é necessário, o desenvolvimento anual de vacinas, baseadas nas cepas mais circulantes no mundo naquele momento, com uma eficiência média de 70% a 90% (Tortora et al, 2005; Burton et al, 1998).

Há outras doenças do trato respiratório inferior, com etiologia, geralmente, bacteriana e eventualmente após uma infecção viral. Doenças como: Coqueluche que é uma infecção bacteriana aguda da infância; tuberculose uma infecção aguda ou crônica do trato pulmonar causada por micobactérias; A legionelose ou doença dos legionários uma pneumonia bacteriana aguda; coccidioidomicose (Tortora et al, 2005; Burton et al, 1998).

Quadro 1: principais doenças do sistema respiratório com suas características mais evidentes, principais agentes causadores e tratamento disponível.*

Doença	Características	Agentes	Tratamento
Resfriado comum	Coriza, espirro e dor de garganta	Rinovírus, parainfluenza, adenovírus e coronavírus	Alívio dos sintomas
Difteria	Pseudomembrana fibrosa faringiana	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Penicilina e eritromicina
Faringite estreptocócica	Placas brancas de pus na garganta	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Penicilina e eritromicina
Crupe	Inchaço subglótico e chiado	Parainfluenza, RSV, influenza e <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Vaporizadores
Pneumonia	Infecção aguda dos pulmões	Bactérias, clamídias, vírus, fungos	Depende do patógeno
Gripe	Infecção viral aguda do trato respiratório	Influenza	Amantadina, Rimantadina, Zanamivir e Oseltamivir (contra influenza A)
Coqueluche	Infecção bacteriana aguda com tosse intensa	<i>Bordetella pertussis</i>	Eritromicina, tetraciclina ou cloranfenicol
Tuberculose	Infecção aguda ou crônica dos pulmões	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Isoniazina, estreptomicina, etambutol e parazinamida
Legionelose	Pneumonia bacteriana aguda	<i>Legionella pneumophila</i>	Eritromicina com rifampina

*Modificado de Burton GEW, Engelkirk PG. Principais Doenças Infecciosas Humanas. In: Burton GEW, Engelkirk PG, autores. Microbiologia para as Ciências da Saúde. 5ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Editora Guanabara Koogan S.A.; 1998. p.219-224.).

1.3. Principais vírus respiratórios

O rinovírus é um vírus da família *Picornaviridae*, que possui capsídeo icosaédrico, não-envelopado, de 22 a 30nm de diâmetro. Seu ácido nucléico é de RNA de polaridade positiva com 8kb. Sua transmissão se dá pelo contato interpessoal com infecção inicial das células da mucosa nasal e, eventualmente, chegando ao trato respiratório inferior. Considerado como o principal agente etiológico do resfriado o vírus está presente em altas concentrações nas secreções e já foi identificado em 40% a 90% das mãos dos indivíduos infectados. Trata-se de um vírus ubíquo comum nos meses com maiores variações de temperatura, umidade e poluição. Por se tratar de uma doença, em geral, benigna, limitada e de curta duração, o uso de técnicas de diagnóstico são raramente utilizadas, contudo podemos usar o isolamento em cultura de células, tais como WI-38, MRC-5 e HeLa. Atualmente não existe vacina contra o rinovírus, porém a droga pleconaril pode ser utilizada clinicamente. (Rácz ML et al, 2004; Couch RB et al, 2001)

O Coronavírus é um vírus da família *Coronaviridae* e apresenta vírions de 100 a 120 nm de diâmetro com envelope. Possui RNA de polaridade positiva com 27 a 32 Kb. Sua transmissão se dá pessoa a pessoa geralmente associada ao resfriado comum. É freqüente nos meses frios com grande variação na incidência de um ano para outro. O diagnóstico geralmente não é realizado por se tratar de uma infecção relativamente leve e auto-limitada. Entretanto é possível o uso de drogas que são efetivas contra rinovírus. No final de 2002 e início de 2003 um novo coronavírus começou a circular, mais tarde batizado de síndrome respiratória aguda grave (SARS), chegando a 29 países e atingindo cerca de 8000 pessoas e uma mortalidade de aproximadamente 10%. Os últimos casos detectados de SARS foram em abril de 2004 (Holmes KV et al., 2001; Kahn JS et al., 2007).

O vírus Influenza é um vírus da família *Orthomyxoviridae*, que possui os gêneros Influenza A, B e C. Vírus pleomórfico de 80 a 120nm, envelopado, com um RNA de fita simples e polaridade negativa e segmentado.

Uma característica destes vírus é a capacidade de aglutinar hemácias de aves e de alguns mamíferos sendo encontrado em um grande número de espécies domesticadas pelos humanos. Os influenza A e B possuem oito segmentos e o Influenza C possui sete segmentos não apresentando o gene da neuraminidase. A partícula viral apresenta envelope com espículas de neuraminidase e hemaglutinina. Os vírus Influenza são disseminados de pessoa a pessoa e são importantes causadores de doenças respiratórias em todas as faixas etárias, associados a doenças respiratórias no trato superior ou inferior. Sintomas comuns relacionados ao quadro clínico são: febre súbita, mialgia, dor de cabeça, tosse seca e inflamação na garganta. Uma complicação comum observada é a pneumonia bacteriana secundária, que é facilitada pelo dano causado ao epitélio respiratório, sendo mais séria em idosos com doença crônica no coração, pulmão ou brônquios. Devido à variabilidade de seus antígenos de superfície, esse vírus são capazes de evadir da defesa do hospedeiro originalmente aptos a se defender dessa ameaça, explicando em parte a causa das grandes pandemias de influenza. Seu diagnóstico pode ser feito pelo isolamento do vírus em culturas de células MDCK ou LLC-MK2, cultivo em ovos embrionados de galinha, pela técnica de inibição de hemaglutinação, pela reação de imunofluorescência ou pela amplificação do RNA por RT-PCR. As drogas disponíveis para o tratamento da infecção pelo influenza A são a amantadina e a rimantadina, que interferem na proteína M2, necessária para que ocorra a descapsidação do vírus que foi endocitado. Além disso, devemos citar os inibidores de neuraminidase Zanamivir e Oseltamivir, que atuam tanto nos vírus influenza A quanto B. Entretanto o modo de ação preventiva mais eficaz tem sido a vacinação anual dos idosos e em indivíduos com risco de complicações em virtude de doenças crônicas. (Ráczy ML et al., 2004; Wright PF et al., 2001).

O vírus Parainfluenza pertence à família Paramyxoviridae, ordem Mononegavirales, gêneros *Respirovirus* (parainfluenza 1 e 3) e *Rubalavirus* (parainfluenza 2 e 4). São vírions de 150nm de diâmetro, pleomórficos e envelopados que apresentam 2 proteínas de superfície: hemaglutinina–neuraminidase (HN) e a proteína de fusão. Seu genoma é um RNA de fita

simples linear polaridade negativa com cerca de 15kb. Os vírus parainfluenza são importantes causadores de doenças respiratórias em crianças e jovens adultos com sintomatologia semelhante ao vírus influenza como febre leve, laringotraqueobronquiolite (crupe) e tosse. Re-infecções ocorrem comumente, resultando em infecções mais leves. Os casos de laringotraqueobronquiolite grave podem ocorrer em 2 a 3% dos casos. Ele é um vírus tido como ubíquo e com alguma variação sazonal, com maior ocorrência nos meses de inverno. Seu diagnóstico pode ser feito pela amplificação de seu ácido nucléico por RT-PCR, por imunofluorescência direta nas células do paciente infectado ou o isolamento viral em células LLC-MK2 ou NCI-H292. Não existe tratamento específico, mas em caso de crupe é feita inalação de ar úmido com epinefrina. Ainda não há registro de vacinas licenciadas para os vírus parainfluenza (Chanock RM et al., 2001; Rácz ML et al., 2004)

Os adenovírus são vírus da família *Adenoviridae*, que possui quatro gêneros: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus*. São vírus não envelopados com um capsídeo icosaédrico de cerca de 80nm de diâmetro e genoma de DNA dupla fita com 26 a 45kb. Os sorotipos de adenovírus são diferenciados com base em reações de neutralização sendo mais de 200 distribuídos em cinco espécies de adenovírus (A, B, C, D, e E). Os adenovírus são causadores de infecções no trato respiratório, olhos, intestinos e, com menor frequência, trato urinário e fígado. Os sintomas respiratórios mais comuns se assemelham aos da infecção por pelo vírus influenza, ou seja, febre, nasofaringite, congestão nasal, tosse e dor de cabeça. Ainda que sua infecção em geral seja totalmente assintomática, complicações podem levar a casos de grave broncopneumonia, otite média ou sinusite. Esse vírus pode ser transmitido pela via oral-fecal ou aerossol e tem sido associado a epidemias ou endemias, comumente em acampamentos militares. Três a cinco por cento das doenças infecciosas na infância são causadas por ele. Os adenovírus têm distribuição mundial. Nas infecções agudas, o adenovírus é excretado por um a três dias na garganta de adultos, três a cinco dias no nariz, na garganta, nas fezes ou nos olhos de paciente com febre conjuntival; duas semanas nos olhos de pacientes

com ceratoconjuntivite; três a seis semanas na garganta ou nas fezes de crianças com doença respiratória; e dois a doze meses ou mais na urina, na garganta ou em biópsias de órgãos de pacientes imunocomprometidos. As linhagens de célula A549, Hep-2, HeLa e KB são as melhores para o isolamento desse vírus (Rácz ML et al., 2004).

Em 2005 foi identificado um novo vírus respiratório, o bocavírus humano (HBoV), pertencente à família parvoviridae gênero Bocavirus. Até então, trabalhos identificaram esse vírus na Europa, América do Norte, Oriente Médio, Ásia, África e América do Sul. As frequências encontradas variaram de 1% a 8%, sendo na maioria em crianças. Alguns estudos relataram diarreia nas crianças com esse vírus, sugerindo que o HBoV pode se estender além do trato respiratório. A co-infecção é outro aspecto notado na literatura, onde na Tailândia foi detectado 4,5% de positivos para HBoV em crianças com pneumonia, sendo que em 83% desses positivos havia a co-infecção com outros vírus. A detecção desse vírus também foi realizada por meio de fezes em crianças com gastroenterites agudas, mas sem doença respiratória, porém em 58% desses casos foi detectado outro patógeno entérico fazendo necessário mais estudos para se esclarecer o real papel do HBoV em doenças entéricas (Kahn JS et al., 2007; Allander T et al., 2008; Gagliardi TB et al., 2008).

O Vírus Respiratório Sincicial está classificado na família Paramyxoviridae ordem Mononegavirales, sub-família Pneumovirinae e gênero *Pneumovirus*. São vírus de 150nm de diâmetro, pleomórficos e envelopados, cujo genoma é um RNA de fita simples linear e polaridade negativa com cerca de 15kb. Codifica dez mRNA. Existe apenas um sorotipo de RSV, com dois subgrupos antigênicos, A e B. Bronquiolites e pneumonias são frequentemente causados por esse vírus em crianças de dois a sete meses, sendo que o contágio se dá por contato direto ou fomites contaminados e o período de incubação é de aproximadamente quatro a cinco dias. A replicação primária de RSV ocorre na camada superficial do epitélio respiratório e a disseminação para o trato inferior ocorre cerca de três dias após o aparecimento de rinoréia. O RSV tem distribuição mundial e a maior incidência ocorre nos meses de inverno ou

chuvosos (Rácz et al, 2004). Foi descrito como o mais importante patógeno viral causador de doenças respiratórias agudas (DRA) das vias respiratórias inferiores, sendo responsável por um elevado índice de hospitalizações de crianças (Glezen et al, 1986). De 1 a 3% de todas as crianças nascidas são hospitalizadas devido a infecções ocasionadas por esse vírus. O RSV também tem sido cada vez mais reconhecido como um importante patógeno dentre a população idosa, principalmente aquela parcela da população que vive em instituições para idosos (Han et al, 1999; Falsey & Walsh, 2000). Em geral, os quadros mais graves são em crianças com menos de 12 meses de idade. As melhores amostras para se fazer o diagnóstico destes vírus são as de aspirado ou lavados de nasofaringe, onde a identificação dos antígenos virais é feita de forma direta por técnica de imunofluorescência direta ou indireta. O isolamento do vírus pode ser feito em culturas de células Hep-2 ou HeLa, quando é possível verificar o aparecimento de sincícios, efeito citopático característico destes vírus três a sete dias após a inoculação. Com a técnica de RT-PCR é possível diagnosticar e tipar as amostras. Desde 1986 um análogo de nucleosídeo, a ribavirina tem aprovação para uso em infecções pelo RSV. Além do RSV humano (sendo subdividido em dois grupos A e B, devido à diversidade antigênica das proteínas de envelope), existem o RSV bovino e o vírus da pneumonia do camundongo (*murine pneumonia virus*). Linhagens de RSV caprino e ovino também têm sido descritas. Os sintomas mais comuns da infecção são: febre moderada, hipoxemia, fadiga, chiado, coriza, tosse, distúrbios respiratórios. Em crianças de baixa idade, o pequeno diâmetro dos bronquíolos e alvéolos facilita a obstrução, causando a gravidade da infecção. Complicações devido à infecção bacteriana secundária, em geral, são raras (Lamb RA et al., 2001; Rácz ML et al, 2004).

O metapneumovírus humano (hMPV) apresenta grande semelhança genética com o metapneumovírus aviário (aMPV) e também, em menor grau, com o vírus sincicial respiratório (RSV). Foi o primeiro membro do gênero *Metapneumovirus* que infecta humanos identificado na Holanda em 2001, através do diagnóstico em várias amostras coletadas a partir de 1958 (Hoogen et al, 2001). O hMPV, assim como o RSV, faz parte da ordem Mononegavirales,

família Paramixoviridae subfamília Pneumovirinae, Ele está associado ao mesmo quadro clínico que o RSV, mas em geral menos graves. Desde sua identificação já foi encontrado na Europa (Itália, França, Espanha, Reino Unido, Alemanha, Dinamarca, Finlândia e Noruega), América (EUA, Canadá, Argentina, Brasil), Ásia (Índia, Japão, China e Singapura), Austrália e África do Sul. Sua distribuição sazonal se assemelha a do RSV, ou seja, com maior número de casos próximo ao inverno (Principi et al., 2006). Pode infectar e não raro re-infectar pessoas de qualquer idade, no entanto é muito mais comum, em idosos, crianças e pessoas com quadros de imunossupressão. Aproximadamente 15% das internações hospitalares por problemas respiratórios são causados pelo hMPV (Bastien et al, 2003). O metapneumovírus, assim como outros vírus respiratórios apresenta um padrão de virose emergente e re-emergente apresentando incidência variando de 5% a 40% de um ano a outro (Maggi et al, 2003). Greensill em 2003 detectou a coinfeção hMPV em 70% das crianças com bronquiolite, causada primeiramente pelo RSV, nas UTIs. Estudos em macacos mostraram que a infecção de hMPV é muito semelhante à de RSV, já que ambos infectam células ciliadas do epitélio respiratório (Kuiken et al, 2004). Em 2001 Hoogen e colaboradores pesquisando amostras de adultos jovens e idosos encontrou 100% de soroprevalência, com títulos neutralizantes estáveis contra o hMPV, indicando que a re-infecção durante a vida é comum (Hoogen et al, 2001).

Outros vírus que também causam doenças respiratórias são: Cocksackievírus, da família *picornaviridae* geralmente causando doenças do trato respiratório superior; Rubella vírus, da família *togaviridae*, causa uma doença da infância conhecida por rubéola com dor de garganta, febre, manchas vermelhas na pele; vírus do sarampo, da família *paramixoviridae*, causador do sarampo; Herpes simplex vírus, Epstein-Barr vírus, Citomegalovírus e Varicella-Zoster são os vírus da família *Herpesviridae* que eventualmente causam doenças respiratórias (Tortora et al, 2005; Burton et al, 1998).

Quadro 2: principais vírus respiratórios com suas famílias, principais doenças associadas e droga disponível para seu controle*

Vírus	Família	Doenças	Controle
Rinovírus	Picornaviridae	resfriado comum	Pleconaril
Coronavírus	Coronaviridae	resfriado comum	Pleconaril
RSV	Paramixoviridae	pneumonia e bronquiolites	Ribavirina
Influenza	Orthomyxoviridae	Gripe	Zanamivir e Oseltamivir
Parainfluenza	Paramixoviridae	rinite, faringite, crupe e pneumonia	Epinefrina no caso de crupe
Adenovírus	Adenoviridae	resfriado, nasofaringite e broncopneumonia	-
hMPV	Paramixoviridae	pneumonia e bronquiolites	Ribavirina
Bocavírus	Parvoviridae	pneumonia e bronquiolites	-

*Modificado de Burton GEW, Engelkirk PG. Principais Doenças Infecciosas Humanas. In: Burton GEW, Engelkirk PG, autores. Microbiologia para as Ciências da Saúde. 5ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Editora Guanabara Koogan S.A.; 1998. p.219-224.).

1.4. Diagnóstico virológico

Não raro, um diagnóstico puramente clínico dificilmente define o agente etiológico de uma infecção respiratória aguda, ou mesmo a definição de sua natureza (viral, bacteriana, protista, fúngica). Doenças do baixo trato respiratório podem, de forma mais comum, ser causadas por mais de 20 organismos virais e bacterianos. Atualmente, são disponíveis diversos métodos de diagnóstico virológico (Ráczy et al., 2004; Stroch GA et al., 2001; Templeton KE et al., 2007).

Um importante passo para o diagnóstico virológico envolve a coleta da amostra, que se não for de boa qualidade acaba comprometendo o diagnóstico. Desta maneira, as principais variáveis relacionadas à qualidade da amostra são: tipo de material, momento da coleta, transporte e armazenamento. Para detecção de vírus respiratórios as melhores amostras são aquelas coletadas do próprio trato

respiratório, onde as principais opções para esse fim são os *swabs* nasais e aspirados de nasofaringe. É importante que no momento da coleta esteja ocorrendo a liberação de partículas virais (geralmente até o quinto dia de infecção) e o transporte em baixas temperaturas (próximo a 4°C) evitando o congelamento que destrói os vírions (Rácz et al., 2004; Stroch GA et al., 2001). Amostras de *swabs* nasais são fáceis e rápidas de se obter, com exceção do RSV (o mais importante vírus em crianças). O aspirado de nasofaringe é um material de melhor qualidade (pela quantidade de células) para a pesquisa da maioria dos vírus respiratórios (com possível exceção do influenza). Uma ressalva que deve ser feita é quanto à maior habilidade que é exigida de quem o coleta, dado desconforto que causa nos pacientes submetido a este procedimento (Heikkinen T et al., 2002; Sung RYT et al., 2008; Loens K et al., 2009).

O cultivo e isolamento de vírus é uma técnica ainda importante e tida como de referência em vários casos para ser descartada totalmente. Essa estratégia apesar de algumas críticas tende a amplificar a quantidade de vírus presente na amostra, facilitando sua identificação e caracterização. As principais desvantagens relativas a esse método são: o período de incubação (pelo menos 3 dias para a maioria dos vírus) e a não existência de linhagens celulares sensíveis para alguns vírus. Alternativamente, dependendo do vírus pode-se usar ovos embrionados de galinha.(Carter J et al., 2007; GA et al., 2001; Eiros JM et al., 2009).

Outros métodos alternativos à cultura são os métodos imunológicos, que através de anticorpos específicos conseguem identificar a grande variedade de vírus respiratórios.. A reação de inibição da hemaglutinação ou mesmo a de hemaglutinação é um exemplo de técnica simples capaz de detectar anticorpos ou antígeno para o vírus influenza. Já a reação de imunofluorescência tem sido usada por diversos laboratórios como um método rápido de identificação dos antígenos virais nas células colhidas do indivíduo infectado com a visualização, em microscópio óptico de fluorescência (Flint ST et al., 2000). Essa técnica foi uma das primeiras que permitiu um diagnóstico viral no mesmo dia da coleta, portanto tendo como vantagem além da velocidade

a capacidade de detecção de vários vírus simultaneamente sem grande acréscimo de tempo ou custo. Como desvantagem temos a baixa sensibilidade, sobretudo se durante a coleta o número de células do epitélio respiratório não for o suficiente para a análise. Uma forma de superar tal dificuldade seria o da escolha de aspirado de nasofaringe, que costuma trazer um maior número de células para o diagnóstico. Outra desvantagem seria o da necessidade de treinamento técnico para a interpretação do resultado e o de nem todo laboratório possuir um microscópio de fluorescência. Embora no mercado existam diversos kits de detecção de vírus respiratórios, é comum não haver disponível reagentes para todos vírus, tanto pela existência de muitos sorotipos quanto pela recente identificação de novos vírus (Madeley CR et al., 2002; Reis AL et al., 2008).

A detecção de ácidos nucleicos virais representou um grande avanço para a virologia. Tal fato pode assim ser aplicado, pelas técnicas de PCR e RT-PCR, para o diagnóstico dos vírus respiratórios. Essas metodologias são tão rápidas quanto às de imunofluorescência, com a vantagem de exigirem menos treinamento da equipe laboratorial além de maior versatilidade. Essas técnicas são famosas por suas sensibilidades, cuja vantagem e desvantagem pode estar relacionadas a isso. Possuem sensibilidade analítica capaz de detectar 1 a 10 cópias de DNA alvo. Sua utilização generalizada tem possibilitado um aumento na detecção de vírus respiratórios contribuindo para o entendimento das doenças de causa viral. Também permitiram a identificação de novos vírus como o metapneumovírus humano, bocavírus humano e três outros coronavírus. Sua versatilidade possibilitou a detecção tanto de um vírus específico ou grupo de vírus através de um PCR genérico que apenas usa um *primer* degenerado, sendo útil para vírus como adenovírus ou rinovírus. Porém uma elevada sensibilidade pode ser desvantagem quando há contaminação de amostras, ou quando há a detecção de um vírus sem importância clínica, já que alguns vírus podem ser liberados sem que isso tenha relação com uma doença, como em indivíduos assintomáticos. (Pozo F et al., 2008; Eiros JM et al., 2009; Reis AD et al., 2008; Storch GA et al., 2000).

Sendo assim, visando conhecer a ocorrência dos vírus RSV e hMPV, em nossa região, estabelecemos um contato com o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP do campus de Botucatu. A identificação dos casos clínicos atribuídos a infecções respiratórias agudas foram identificados na população atendida neste Hospital. Acreditamos que em conjunto com os principais aspectos clínicos relacionados a esses vírus poderemos, dessa maneira, obter um perfil da prevalência dos dois vírus anteriormente citados.

2. Objetivos

Geral

- Pesquisar os vírus: Vírus sincicial respiratório; metapneumovírus; influenza A e B; parainfluenza 1,2 e 3; adenovírus em crianças menores de cinco anos atendidas no hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Específicos

- Traçar o perfil de sazonalidades dos vírus: Vírus sincicial respiratório metapneumovírus; influenza A e B; parainfluenza 1,2 e 3; adenovírus.
- Comparar os métodos: imunofluorescência indireta e PCR para detecção de RSV.

3. Casuística e Métodos

3.1. Pacientes e espécimes clínicos:

Estudo de serie de casos que incluiu crianças com até cinco anos de idade, admitidas no pronto atendimento; enfermaria pediátrica; UTI-pediátrica e UTI-neonatal do Hospital das Clínicas da UNESP em Botucatu, no período de março de 2005 a junho de 2006. A inclusão dos pacientes no estudo foi feita pelos médicos assistentes, após assinatura, do termo de consentimento livre e esclarecido, pelos pais. Os dados de identificação; histórico do paciente; parâmetros clínicos e diagnóstico no momento da admissão foram registrados em formulário padrão (anexo 2).

Todos estes casos foram clinicamente identificados pelos médicos pediatras que trabalhavam nos setores acima descritos e após a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido, pelos pais, (anexo 1) procedeu-se à colheita do material clínico. Além disso, um formulário (anexo 2) foi preenchido pelo clínico com questões relacionadas ao quadro clínico geral do paciente bem como à infecção respiratória. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unesp

Os espécimes foram colhidos a partir de aspirados de nasofaringe e “swabs” nasais. No caso das crianças internadas, a coleta foi realizada no primeiro dia da internação. Os aspirados e “swabs” de cada paciente foram diluídos, em um mesmo tubo, em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,2, para um volume mínimo de 3 ml e transportados, sob refrigeração, para o laboratório de virologia do departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP campus de Botucatu.

3.2. Processamento das amostras

Para o processamento das amostras, solução de aspirado de nasofaringe e *swab* nasal, foi realizado inicialmente a divisão da mesma em seis alíquotas com diferentes propósitos. Sendo assim, três alíquotas de 250µl foram

estocadas, a -70°C com 750 μl de TRIzol[®] LS - Invitrogen[®] (para posterior extração de RNA ou DNA). O restante da amostra foi tratada, com penicilina-estreptomicina (concentração final de 2000U/ml), fungizona (concentração final de 10 $\mu\text{g/ml}$) e gentamicina (concentração final de 20 $\mu\text{g/ml}$), por uma hora e então dividido em mais duas alíquotas de 500 μl , sendo uma para uso no isolamento em cultura de células e outra para estoque. Nessas duas alíquotas, igual volume de meio de congelamento (15% de soro fetal bovino, 10% de glicerol e 75% de meio MEM - Minimum Essential Media - Invitrogen), sendo em seguida imerso em nitrogênio líquido por 40 segundos e então estocado em freezer a -70°C para posterior uso.

O restante da amostra (cerca de 1250 μl) foi usado para preparo de lâmina para uso em reação de imunofluorescência (IF). Primeiramente, o volume da amostra foi completado até o volume de 14 ml, em tubo do tipo Falcon de 15 ml, e centrifugada, 3 vezes, a 1250g por 10min a 4°C . Após a última centrifugação, o sobrenadante do tubo foi descartado, e o restante do material ressuspenso para posterior uso. As lâminas foram devidamente identificadas com o número da amostra, data e tipo de lâmina (triagem ou tipagem) (figura 2). O material centrifugado foi pipetado na lâmina de tipagem (MAbs), 8 poços por amostra (10 μL por poço), e na lâmina de triagem, 3 poços por amostra (10 μL por poço). Depois de colocado na lâmina, o material foi seco no fluxo laminar. Após a secagem, o material foi fixado em acetona por 10 minutos, e seca em fluxo laminar novamente. A lâmina foi armazenada em freezer de -20°C para posterior análise em microscópio de fluorescência.

3.3. Diagnóstico por imunofluorescência Indireta

O método de imunofluorescência indireta (IF) foi realizado em duas etapas. Na primeira somente as lâminas “Triagem” foram utilizadas e lidas, de tal forma que se houvesse a ocorrência de resultado positivo na leitura do poço “pool” da lâmina “Triagem” era efetuada a reação de imunofluorescência na lâmina “MAbs”.

Triagem: Em cada poço da lâmina, no sentido vertical e sucessivamente, foram adicionados 10 μ L das soluções “pool” (solução com anticorpos monoclonais contra: Adenovírus; influenza A e B; parainfluenza 1, 2 e 3; e RSV), “RSV” (solução com anticorpos monoclonais contra hRSV) e controle negativo (solução com anticorpos inespecíficos) conforme exemplificado na figura 2.

MAbs: Foram adicionados em cada poço da lâmina, no sentido horizontal e sucessivamente, 10 μ L das soluções com anticorpos dos que se seguem: RSV; Influenza A e B; Parainfluenza 1, 2 e 3; Adenovírus e Controle Negativo (anticorpos inespecíficos) conforme exemplificado na figura 2.

Após a adição dos anticorpos, foi realizada uma incubação em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. A seguir foi feita a lavagem das lâminas.

Lavagem das lâminas: as lâminas foram então lavadas duas vezes com solução, tampão salina fosfato (PBS) mais 0,5% de tween (PBS/T), de pH7, 2. E então deixadas em PBS/T por 10 minutos, num recipiente próprio (caixa para banho histológico). Uma segunda lavagem foi realizada com água destilada, seguida por um banho de 5 minutos no mesmo tipo de água. Após a retirada do banho, as lâminas foram secas em fluxo laminar. Depois de secas, 10 μ L de conjugado-fluoresceína foram adicionados (soro anti-gamaglobulina de camundongo conjugado com fluoresceína, diluído em PBS pH 7,2 com Azul de Evans 0,02%) em todos os poços até então utilizados.

Em seguida as lâminas foram incubadas novamente em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após a incubação os mesmos procedimentos de lavagens já descritos anteriormente foram realizados. Após a secagem das lâminas foi adicionada uma gota de glicerina tamponada e colocada uma lamínula sobre o material. O excesso de glicerina foi retirado com papel absorvente. Após 5 a 10 minutos a leitura das lâminas foi realizada. Caso a leitura não pudesse ser realizada no momento, as lâminas foram envoltas em papel absorvente e papel alumínio e guardadas em freezer – 20°C.

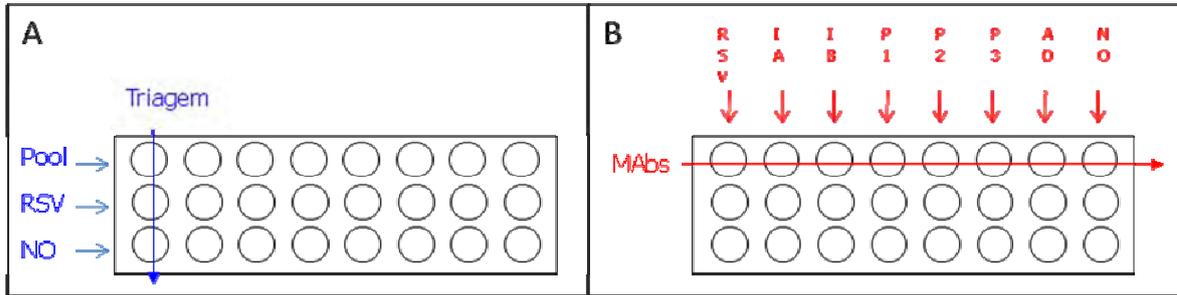


Figura 2: Representação da aplicação das amostras nas lâminas. Em A, é representada a lâmina de triagem, onde “Pool” é a solução de anticorpos monoclonais contra: Adenovírus; influenza A e B; parainfluenza 1, 2 e 3; e RSV. “RSV” é solução com anticorpos monoclonais contra hRSV. “NO” é solução com anticorpos inespecíficos. Em B, é representada a lâmina de MAbs, onde soluções com anticorpos são representadas pelas siglas: “RSV” para anti-RSV; “IA” para anti-influenza A; “IB” para anti-influenza B; “P1” para anti-parainfluenza 1; “P2” para anti-parainfluenza 2; “P3” para anti-parainfluenza 3; “AD” para anti-adenovírus; “NO” é solução com anticorpos inespecíficos.

3.4. Diagnóstico por RT-PCR para RSV

3.4.1 Primers escolhidos para RSV

Para a detecção das amostras foram utilizados os *primers* “GAB”, “FV” e “F1”. Os *primers* GAB e FV produzem um produto amplificado de 653 pares de base (pb) para as amostras do grupo A e 656 pb para as amostras do grupo B. O *primer* GAB corresponde ao gene da proteína G (de seqüência 5'-YCA YTTTGAAGTGTTCAACTT- 3'), e o FV ao gene da proteína F (de seqüência 5'-GTTATGACACTGGTATACCAAC- 3'), sendo que o gene para a proteína F é imediatamente anterior ao gene para a proteína G, na direção 5'-3' do genoma (Zheng et al,1996).

Para reação de “semi-nested” foram usados os *primers* “GAB” e “F1” que a partir do produto amplificado no primeiro PCR, produz um amplificado de 489 para amostras do grupo A e 492 pb para amostras do grupo B. O *primer* F1 corresponde ao gene da proteína F (5'-AACTCCATTGTTATTTGCC-3') (Peret et al, 2000).

3.4.2.Extração do RNA

A partir da amostra estocada previamente com TRIzol LS ((250µl de amostra + 750µl de TRIzol LS), procedeu-se ao acréscimo de 200µl de clorofórmio em cada amostra, homogeneização em *vortex* e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C o sobrenadante foi transferido para outro tubo e onde adicionaram-se 500µl de isopropanol, com posterior incubação por 15 minutos em gelo e centrifugação a 12000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 1ml de etanol 75% seguido de uma centrifugação a 7400 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o “pellet”, após secagem, ressuspenso em 45µl de água ultra pura (“MilliQ”) tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato – Sigma) mais 5µl de RNaseOUT (Invitrogen®). Esse RNA foi, então, estocado em -70°C ou usado para transcrição reversa.

3.4.3.Transcrição reversa

O cDNA foi transcrito, reversamente, a partir de 4µl de RNA extraído. Primeiro, adicionou-se 1µl de “random *primer*” (250µg/ml) e incubou-se essa solução por cinco minutos a 70°C, para desnaturação sendo então transferido para um banho de gelo. Em seguida foi acrescentada uma segunda solução contendo: 4µl de ImProm-II 5x Reaction Buffer (Promega®), 0,5mM de dNTP, 2mM de MgCl₂, 40u de RNaseOUT (Recombinant Ribonuclease Inhibitor - Invitrogen®), 0,5µl “ImProm-II Reverse Transcriptase” (Promega®) e água, tratada com DEPC e autoclavada, para completar um volume de 15µl. Essa mistura foi levada ao termociclador pré-aquecido a 25°C com as seguintes condições de ciclagem: 25°C por cinco minutos (anelamento do “*primer*”), 42°C por uma hora (fase de extensão) e 70°C por 15 minutos (para inativação da transcriptase reversa). O cDNA obtido foi usado nas reações de PCR para RSVe *hMPV* e/ou estocado para posterior utilização a -20°C.

3.4.4. Amplificação do RSV

A amplificação foi efetuada a partir de 3µl de solução de cDNA com 1,25µl de cada *primer* (GAB/FV para PCR do RSV, GAB/F1 para PCR “semi-nested” do RSV), 12,5µl de GoTaq® Green Master Mix (solução de DNA polimerase em tampão de reação, duas vezes concentrado e em pH8,5, 400µM de dNTP e 3mM de MgCl₂ - Promega®) e água (tratada com DEPC e autoclavada) para completar 25µl por amostra. As amostras foram amplificadas no termociclador, sem a necessidade de adição de óleo para prevenção de evaporação da amostra. Na primeira reação de PCR para RSV foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 94°C por um minuto; 55°C por um minuto e 72°C por um minuto, então uma última fase de extensão de 7 minutos a 72°C. A PCR “semi-nested” do RSV foi feita com os seguintes passos: uma primeira desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 94°C por um minuto; 55°C por um minuto e 72°C por um minuto e uma última fase de extensão de 7 minutos a 72°C. O produto dessas duas reações pode então ser usado na eletroforese ou estocado a 4°C.

3.4.5. Análise dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Oito microlitros do produto amplificado foi aplicado em gel de agarose 1,5% (Gibco BRL) em tampão Tris-Borato-EDTA 1x [90 mM de Tris-Borato e 2mM de EDTA (pH 8,0)], com adição de Brometo de Etídio numa concentração final de 0,5 µg/ml. As voltagens utilizadas foram: 80mV nos primeiros 5 minutos e 120 mV para o restante da “corrida”. As bandas de DNA foram visualizadas em trans-iluminador com luz UV.

3.5. Diagnóstico por RT-PCR para HMPV

3.5.1. Primers escolhidos para HMPV

Para o PCR de HMPV foi utilizado os *primers* “FR” e “FF”, que produzem um produto amplificado de 347 pb. Os *primers* FF (de seqüência 5'-GAGCAAATTGAAAATCCCAGACA-3') e FR (de seqüência 5'-GAAAAGTCCCGCACAAACATTTAG-3') correspondem ao gene da proteína F. (Peret et al., 2002).

3.5.2. Extração do RNA

Conforme descrito no item “3.4.2.Extração do RNA”.

3.5.3. Transcrição reversa

Conforme descrito no item “3.4.3. Transcrição reversa”.

3.5.4. Amplificação do hMPV

A amplificação foi efetuada a partir de 3µl de cDNA com 1,25µl de cada *primer* (FF/FR para PCR do hMPV), 12,5µl de GoTaq® Green Master Mix (DNA polimerase em tampão de reação, duas vezes concentrado pH8,5, 400µM de dNTP e 3mM de MgCl₂ - Promega®) e água (tratada com DEPC e autoclavada) para completar 25µl por amostra. As amostras foram amplificadas no termociclador, sem a necessidade de adição de óleo para prevenção de evaporação da amostra. A amplificação utilizou as seguintes condições: desnaturação de 95°C por três minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 45 segundos; 54°C por 45 segundos; e 72°C por 45 segundos com uma última fase de extensão de 7 minutos a 72°C. O produto dessa reação pode então ser usado na eletroforese ou estocado a 4°C.

3.4.6. Análise dos produtos amplificados

Conforme descrito no item “3.4.5. Análise dos produtos amplificados”.

3.6. Análise estatística

Os resultados obtidos na reação de imunofluorescência indireta para RSV foram comparados aos de PCR para RSV. O total de amostras negativas e positivas desses dois métodos foram considerados no cálculo. O teste estatístico “ κ ” de Cohen Kappa (Landis JR et al., 1977). Segundo o resultado deste cálculo, a concordância entre os métodos foi considerada: pobre se $\kappa \leq 0,2$; pouca concordância se $0,21 \leq \kappa \leq 0,40$; moderada concordância se $0,41 \leq \kappa \leq 0,60$; grande concordância se $0,61 \leq \kappa \leq 0,80$; e quase perfeita concordância se $0,80 \leq \kappa$.

3.6. Parâmetros clínicos

A aquisição dos parâmetros clínicos foi realizada através da equipe responsável pela coleta das amostras de nasofaringe. Tosse, coriza, espirros, febre, chiado, peito cheio e falta de ar, apnéia, obstrução e necessidade de ventilação mecânica foram os parâmetros considerados. Seguiu-se a soma desses dados segregando-os segundo os resultados obtidos por PCR para RSV e hMPV. Os resultados considerados na segregação foram: número total de amostras testadas; amostras negativas; amostras positivas para hMPV e negativa para RSV; amostras positivas para RSV e negativas para hMPV; e amostras positivas para hMPV e RSV.

4. Resultados

No período entre março de 2005 a junho de 2006, foram coletadas e avaliadas 142 amostras, sendo que seis não tiveram a ficha de características clínicas preenchida.

4.1. Imunofluorescência Indireta

Do total de 142 amostras analisadas pela imunofluorescência indireta, 84 (59,15%) foram negativas para todos os vírus testados, 60 (42,25%) foram positivas para RSV, 2 (1,40%) foram positivas para adenovírus e parainfluenza 1, 1 (0,70%) positiva para parainfluenza 2 e influenza B, 7 (4,92%) foram positivas para parainfluenza 3 e 6 (4,22%) positivas para influenza A.

O padrão de imunofluorescência esperado e encontrado em amostras positivas para RSV é documentado na figura 3a. Na figura 3b pode ser observado um resultado negativo para este mesmo vírus. A distribuição geral dos resultados obtidos por esta técnica é mostrada nas figura 4, 7 e 8.

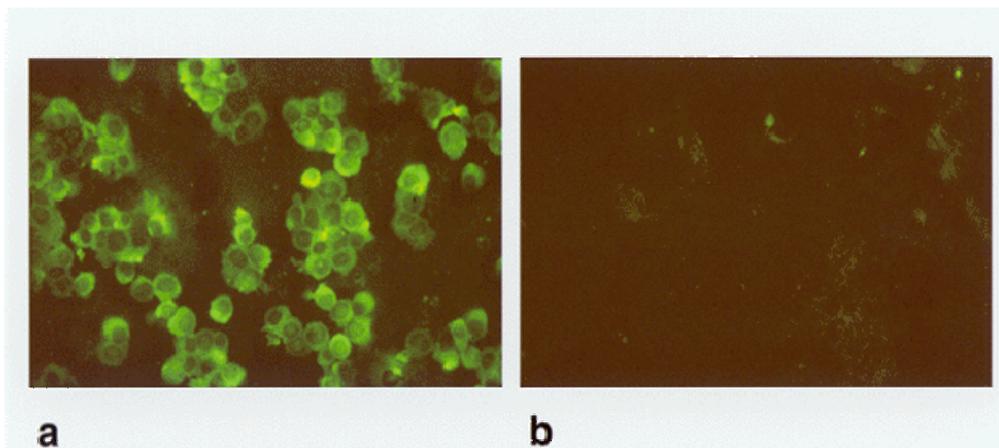


Figura 3: Teste de Imunofluorescência para detecção do vírus respiratório sincicial (RSV) por detecção indireta. **a)** Amostra positiva para RSV. **b)** Amostra negativa para RSV.

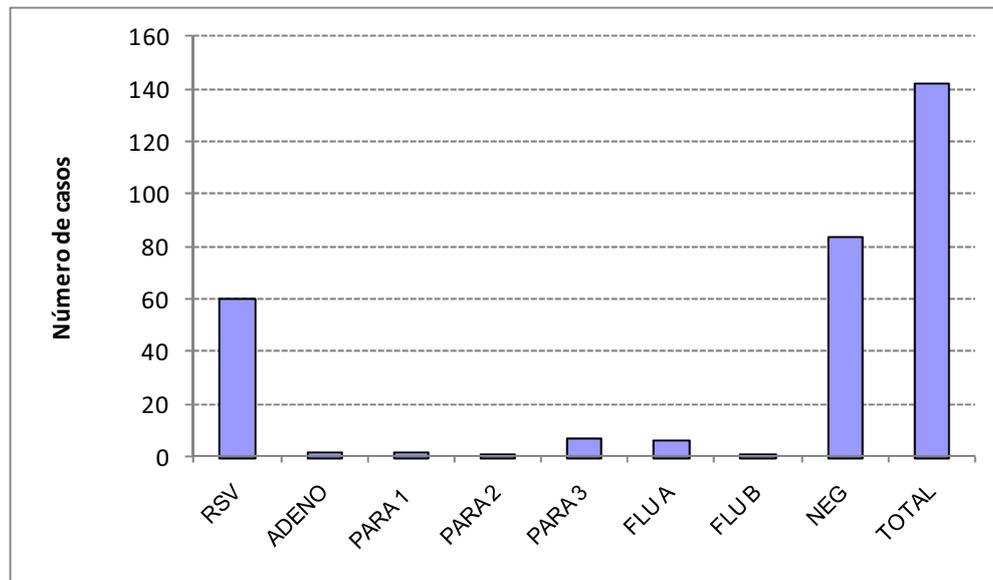


Figura 4: Total das amostras positivas por imunofluorescência, de março de 2005 a junho de 2006.

4.2. Detecção de RSV por PCR

As 142 amostras também foram avaliadas quanto à presença de RSV através PCR. 62 amostras (43,66%) foram positivas para este vírus. Os picos de infecção foram os meses de maio de 2005 e 2006 com, respectivamente 10 e 14 amostras positivas, e os meses de junho de 2005 e 2006 com, respectivamente 10 e 12 amostras positivas. Dados mostrados na figura 9. O número total de casos avaliados nas diferentes faixas etárias bem como o número de amostras positivas para RSV em cada uma dessas faixas etárias é mostrado na figura 5. Como pode se observar, a grande maioria das amostras foi oriunda de crianças com até 6 meses de idade

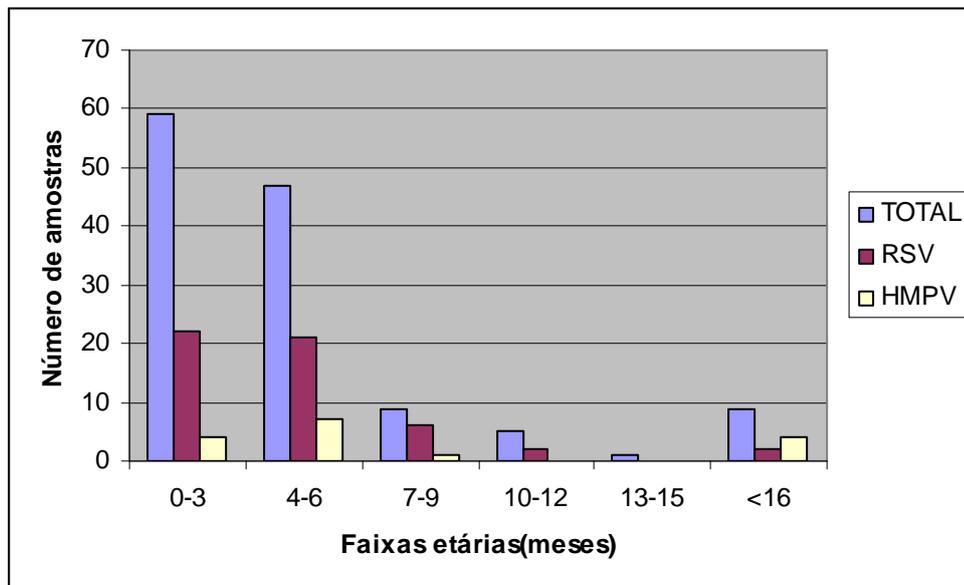


Figura 5: Distribuição total das amostras positivas por PCR para hMPV e RSV, de março de 2005 a junho de 2006.

4.3. Detecção de hMPV por PCR

As 142 amostras também foram avaliadas quanto à presença de hMPV através PCR. Dezenove amostras (13,38%) foram positivas para este vírus. A presença de uma banda de 347bp amplificada pelo uso de primers específicos para hMPV é exemplificada na figura 6. Os picos de infecção foram o mês de junho de 2005 com 6 amostras positivas e maio de 2006 com três amostras positivas pela reação de PCR (30,00% das amostras de junho de 2005) e alguma incidência no outros meses (31,57% das amostras não foram do período maio-agosto). Dados mostrados na figura 9.

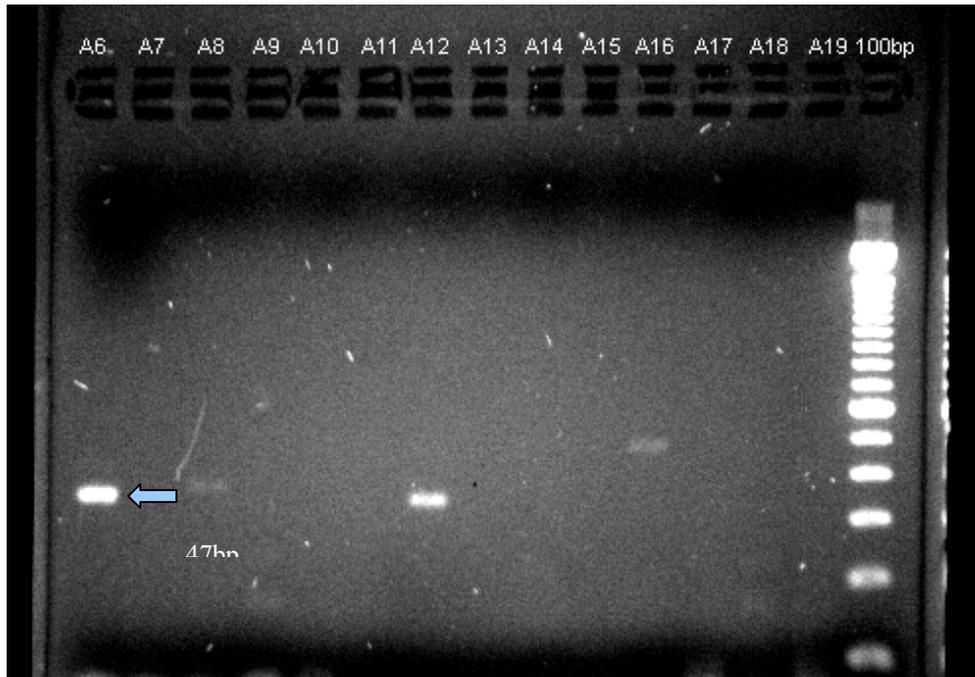


Figura 6: Gel de eletroforese, a 1,5% e Brometo de etídio, para detecção de HMPV. Amostras A6 e A12 são, evidentemente, positivas.

4.4. Comparação entre as técnicas de imunofluorescência e PCR para detecção de RSV.

Das 60 amostras positivas por imunofluorescência, 55 foram positivas e 5 negativas quando testadas através da técnica de PCR. Também foi observada uma concordância bastante elevada entre estas duas metodologias nos casos negativos. Entre as 82 amostras negativas por imunofluorescência, 75 amostras foram também negativas por PCR. Entretanto, 7 destas amostras negativas por imunofluorescência foram positivas quando testadas por PCR. O índice de concordância κ entre esses dois métodos foi de 0,82 (concordância quase perfeita). Estes resultados podem ser visualizados na tabela 1.

	PCR+	PCR-	Total
IF+	55(38,7%)	5(3,5%)	60(42,2%)
IF-	7(4,9%)	75(52,8%)	82(57,7%)
Total	62(43,6%)	80(56,3%)	142(100%)

Tabela 1: Tabela comparativa das técnicas de PCR (PCR+/PCR-) e de imunofluorescência indireta (IF+/IF-).

4.5. Prevalência viral no período de março de 2005 a junho de 2006

A prevalência viral incluindo todos vírus investigados por imunofluorescência é mostrada na figura 4. A frequência de cada vírus é mostrada nas figuras 7, 8 e 9. Como pode se observar, houve uma frequência de amostras mais elevada no início do inverno. De forma geral esta tendência se mantém para os vírus RSV e FLU A como demonstrado na figura 8 e 9. Os vírus PARA 1, PARA 2, ADENO e FLU B apresentaram frequência muito baixa. O vírus PARA 3 apresentou frequência distribuída por todo o período. É importante ressaltar, entretanto, que esta maior incidência nos meses de maio e junho é mais evidente no caso do RSV. Por exemplo, 50 amostras foram positivas para este vírus neste período. Apenas 16,6% das amostras positivas para RSV foram coletadas fora do período maio-agosto.

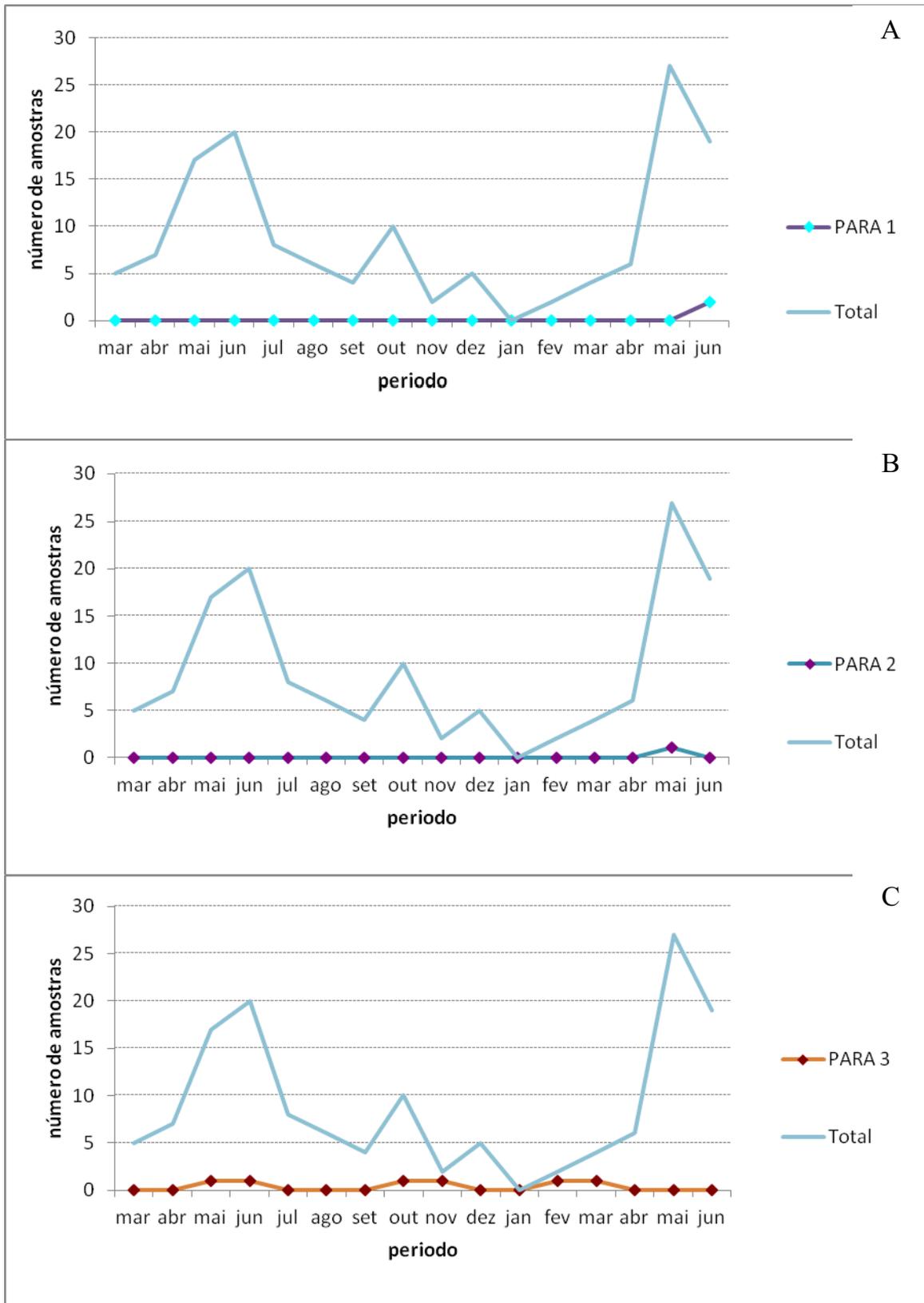


Figura 7: Distribuição total das amostras positivas por imunofluorescência para parainfluenza 1 em A; parainfluenza 2 em B; e parainfluenza 3 em C no período de março de 2005 a junho de 2006. Cada gráfico apresenta um vírus e o total.

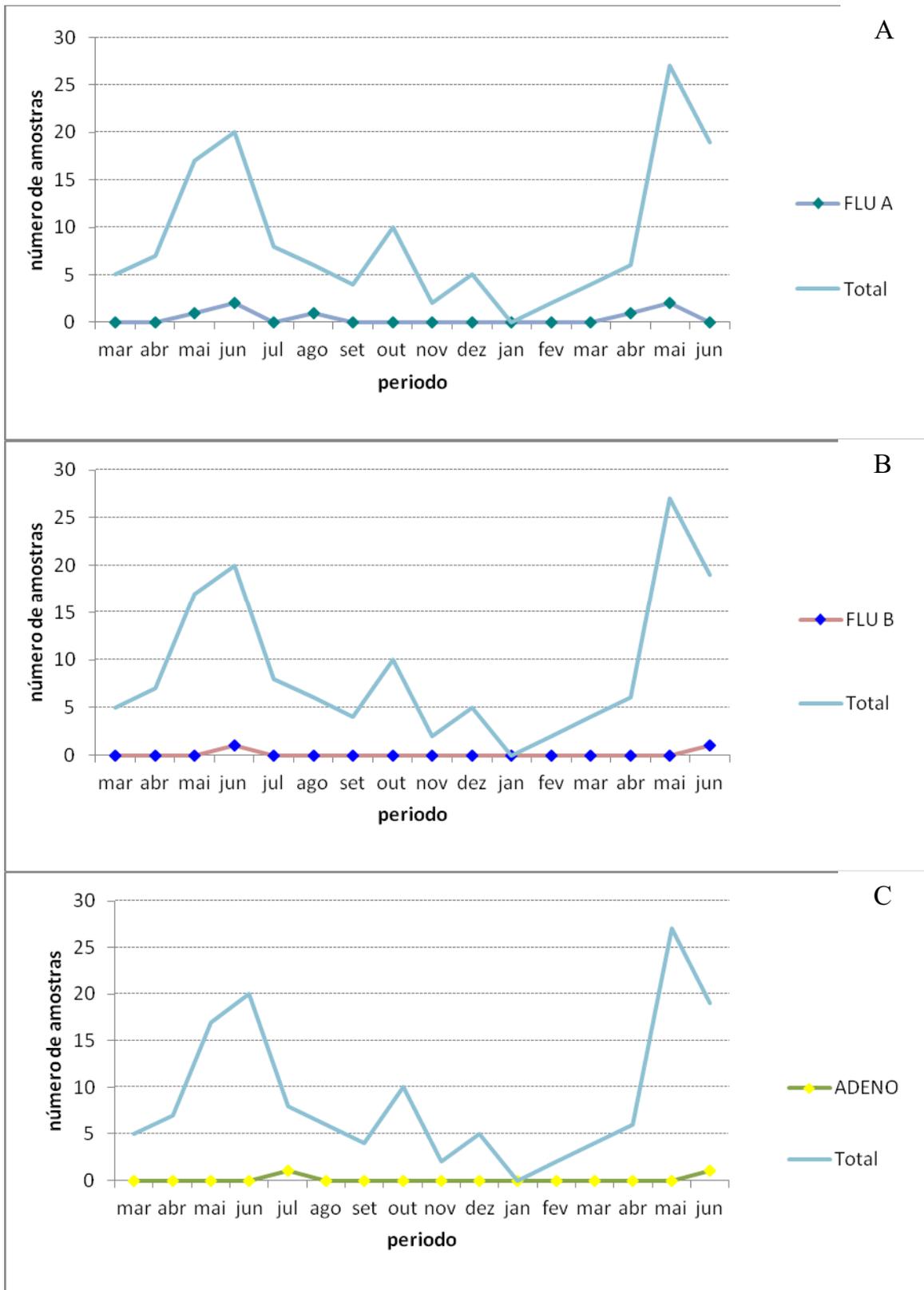


Figura 8: Distribuição total das amostras positivas por imunofluorescência para influenza A em A; influenza B em B; e adenovírus em C no período de março de 2005 a junho de 2006. Cada gráfico apresenta um vírus mais e o total.

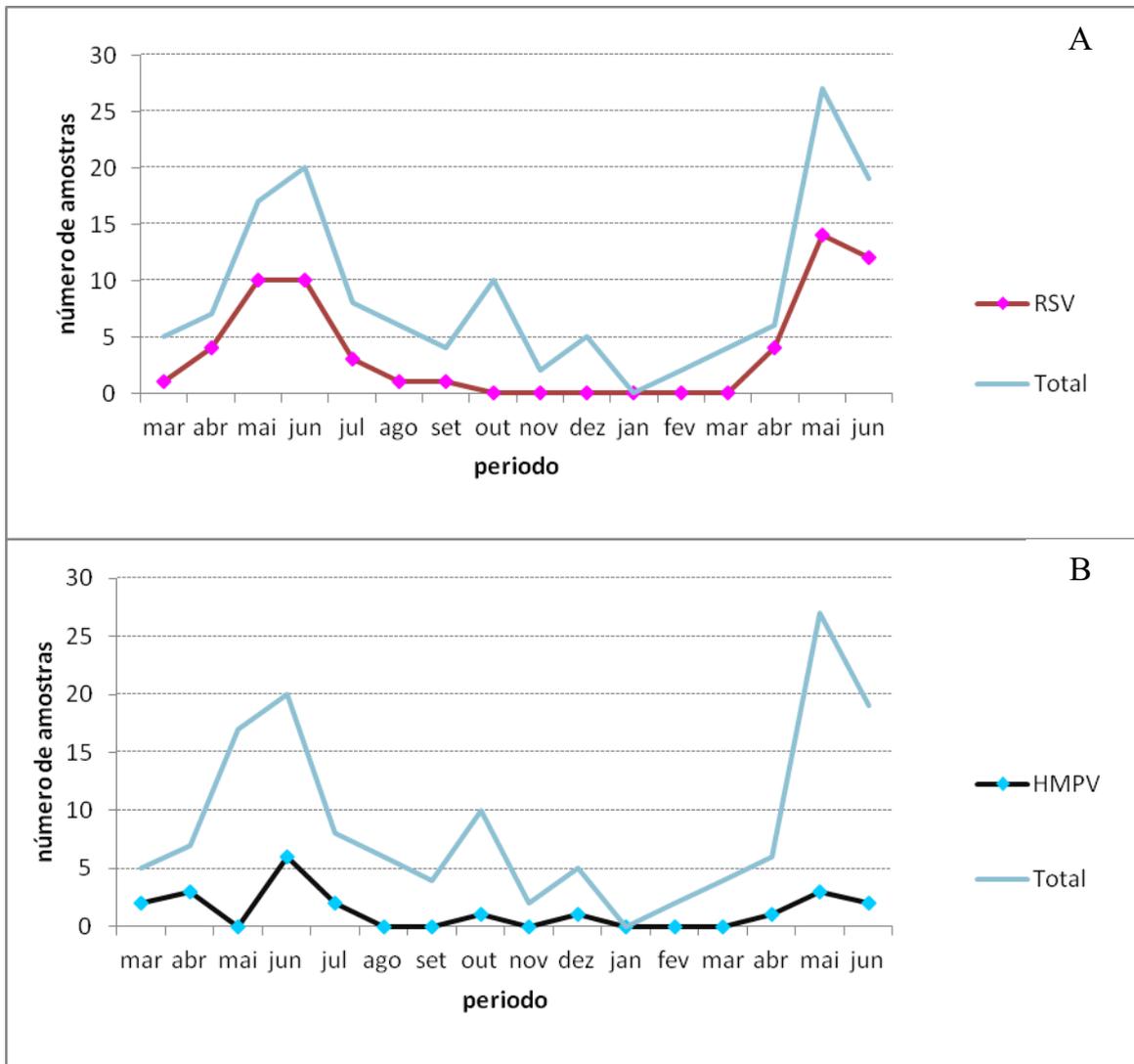


Figura 9: Distribuição total das amostras positivas por PCR para RSV em A e hMPV em B, no período de março de 2005 a junho de 2006. Cada gráfico apresenta um vírus e o total.

4.6. Dados Clínicos

Do total de 142 amostras com dados clínicos apurados, a tosse foi o parâmetro mais referido (de 79,68 a 88,88%). Chiado no peito, geralmente associado a RSV, apresentou incidência semelhante nos casos de RSV, hMPV e negativos. A necessidade de ventilação mecânica foi mais encontrada nos casos de hMPV positivos, dados mostrados na tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros clínicos encontradas, separadas por vírus encontrados. Onde HMPV=Somente Metapneumovírus humano, RSV= Somente Vírus respiratório sincicial, Coinfecção= Metapneumovírus humano e Vírus respiratório sincicial e Negativo= nenhum dos dois vírus.

	Negativo	Coinfecção	RSV	HMPV	Total
amostras	64	13	46	9	132
parâmetros					
tosse	51	11	43	8	113
coriza	23	4	22	4	53
espirros	27	6	21	2	56
febre	29	9	28	6	72
chiado	37	9	31	7	84
peito cheio	44	11	40	7	102
falta de ar	33	10	39	8	90
apneia	8	5	9	2	24
obstrução	26	7	36	4	73
ventilação mecânica	24	5	21	7	57

5. Discussão

Doenças agudas do trato respiratório são a causa mais comum de morbidade e mortalidade em crianças no mundo, causando aproximadamente 30% de todas as mortes dessas crianças nos países em desenvolvimento (Tomazelli LM et al., 2007). Considerando-se apenas doenças agudas do trato respiratório inferior, 19% de todas as mortes (em sua maioria diagnosticadas como pneumonia) de crianças menores de 5 anos se devem a microrganismos de modo geral (International Conference on Acute Respiratory Infections, 1997). Dentre estes, o agente etiológico identificado em 50% a 90% dessas infecções são virais (Tomazelli LM et al., 2007). Infelizmente não é possível diferenciar um ou outro vírus apenas pelos sinais clínicos ou radiografias, havendo o isolamento e identificação do agente em menos de 1% dos casos de infecções pneumônicas (Templeton KE et al., 2007). Assim sendo, em nosso estudo procuramos identificar quais os principais vírus causadores de doenças respiratórias agudas em crianças através de um teste de imunofluorescência e PCR, bem como suas frequências ao longo do ano através de coleta de aspirados de nasofaringe e *swabs* nasais de crianças com até cinco anos de idade que apresentaram infecção respiratória aguda (IRA), atendidas no pronto socorro, internadas na UTI neonatal, internadas na enfermaria ou UTI pediátrica do Hospital das Clínicas da UNESP em Botucatu, no período de março de 2005 a junho de 2006.

A identificação do vírus associado à determinada infecção é importante não só para um tratamento mais adequado do paciente, mas também para se conhecer quais vírus estão presentes em uma dada comunidade, possibilitando melhores estratégias no desenvolvimento de vacinas (Madeley CR et al., 2002). Já foi demonstrado que um diagnóstico rápido e preciso de infecções respiratórias virais, de adultos ou crianças, reduz o tempo de hospitalização e uso de antibióticos. Como consequência, temos a redução de custo no tratamento dos pacientes, melhor controle de infecções nosocomiais e um uso mais eficiente de medicamentos antimicrobianos (colaborando para o não aumento da resistência bacteriana) (Madeley CR et al., 2002). Já se constatou que

além do benefício para o paciente, encorajar médicos a fazerem uso de métodos rápidos de detecção de vírus, resulta em maior número de amostras enviadas para o diagnóstico laboratorial. Outro fator que se verifica é um aumento na identificação clínica e tratamento dos indivíduos infectados por RSV, porém não se deve subestimar a contribuição dos métodos de diagnóstico no laboratório. Dentre os testes rápidos primordialmente desenvolvidos e posteriormente comercializados temos os painéis de vírus respiratórios comercializados por diversas empresas para a detecção específica de vírus por imunofluorescência.

O procedimento para se obter uma amostra adequada para detecção da maioria dos vírus respiratórios é, em geral, realizado através de aspirado de nasofaringe (NPA), um método desconfortável e invasivo aos indivíduos a ele submetidos. Neste sentido ao analisarmos a literatura quanto ao tipo de procedimento de coleta verificamos que existem trabalhos que demonstram que *swab* de nasofaringe (NS), método mais confortável que o NPA, resultam em material de tão boa qualidade quanto este na detecção do vírus influenza A através do teste de imunofluorescência (Heikkinen T. et al., 2001). Porém o mesmo não é observado para a detecção de RSV e influenza B através da imunofluorescência onde o *swab* apresenta uma significativa redução de sensibilidade (Sung RY et al., 2008). A coleta de boas amostras para imunofluorescência requer uma grande quantidade de células infectadas e integras, sendo necessário um treinamento para que uma equipe de coleta mais experiente e habilidosa, possa realizar o procedimento de modo menos traumático ao paciente a ele submetido. Os *swabs* nasais geralmente resultam em menor quantidade de células, insuficiente para um diagnóstico preciso. Fica assim evidente que uma boa coleta é importante para qualquer diagnóstico laboratorial, contudo a imunofluorescência acaba requerendo material de melhor qualidade. Desta maneira, Madeley e colaboradores optaram pelo uso do NPA em conjunto com NA acarretando em um número reduzido de amostras inadequadas (Madeley et al., 2002). Essa mesma estratégia foi por nós adotada para a coleta, conforme descrito no item 3.1.

Tão importante quanto o material colhido para o diagnóstico, o tempo necessário para se chegar ao resultado final também deve ser considerado. Assim sendo, dentre as diferentes estratégias de diagnóstico de vírus em geral, o uso das culturas de células que muitas vezes é considerado de referência para diversos vírus, torna-se um obstáculo para outros. Mais especificamente em relação aos vírus respiratórios, temos na literatura relatos que referem o aparecimento de efeitos citopáticos (ECP) característicos entre 3 a 5 dias para o vírus RSV em linhagens Hep-2 e de 7 a 10 dias para outros vírus respiratórios (Leland DS, 1996). Uma forma de superar esta desvantagem é usar uma técnica conhecida como *shell vial*. Inicialmente desenvolvida para o cultivo de *Chlamydia trachomatis*, diversos autores notaram que uma prévia centrifugação do material a ser inoculado na cultura de células aumenta a infecciosidade dos vírus. O mecanismo para isto ainda não é totalmente conhecido, mas especula-se que pode envolver a agregação de vírus a *debris* celular ou até mesmo um efeito nas membranas das células que facilita a adsorção e entrada dos vírus (Landry ML, 2009; Leland DS, 1996). Mesmo com o conhecimento desta estratégia associada ao isolamento dos vírus em cultura o tempo para o cultivo e isolamento ainda é uma desvantagem importante a ser considerada na obtenção dos resultados.

Em nosso projeto, um dos compromissos adotados com o pessoal da Faculdade de Medicina de Botucatu, ao estudar as crianças atendidas no serviço com doenças respiratórias, era o de repassar o resultado do diagnóstico laboratorial o mais rápido possível. Para isso, precisaríamos usar técnicas rápidas e sabidamente padronizadas no mercado. Desta maneira, a escolha da reação de imunofluorescência, possibilitou o diagnóstico em até 24 horas, o que permitiu um *feedback* aos clínicos responsáveis pelo acompanhamento dos casos. A imunofluorescência tem essa vantagem na rapidez do diagnóstico, porém necessita uma equipe bem treinada para coleta, bem como experiência na interpretação do resultado. Ainda em relação ao tempo, devemos destacar as técnicas de biologia molecular e dentre elas aquelas que amplificam o ácido nucléico viral, que é o caso da reação de PCR e RT-PCR. É uma técnica muito

sensível e com resultados em tempo viável para auxiliar o médico em sua conduta clínica (Sung RY et al., 2008).

Como esperado em uma população pediátrica, o vírus RSV foi o mais encontrado, ou seja, em 60 amostras num um total de 68 amostras que foram positivas para algum vírus testado na imunofluorescência, valor próximo ao encontrado em outros trabalhos (Pecchini R et al., 2008). RSV é o principal agente etiológico causador de doença respiratória aguda em crianças menores de 1 ano de idade. Aos 2 anos de idade virtualmente 100% das crianças já foram infectadas e de 10 a 20% delas reinfectedas por esse vírus (Calegari T et al., 2005; Pecchini R et al., 2008). Em relação às faixas etárias encontradas nesse trabalho, 95% das amostras positivas de RSV foram coletadas de crianças com menos de 12 meses de idade.

O risco de adquirir-se RSV é grandemente aumentado em gestações com menos de 35 meses ou com peso de menos de 2500 gramas ao nascer, acredita-se que esse risco aumentado deve-se ao fato de que há um influxo de imunoglobulina G, via placenta, da mãe para o feto, o que daria proteção parcial contra infecções, além de grande aumento do diâmetro dos bronquíolos e alvéolos (Ricetto AGL et al., 2006; Pecchini R et al., 2008).

Em infecções causadas por RSV, há uma tendência de crianças do sexo masculino serem mais atingidas que as do sexo feminino (Holberg CJ et al., 1991; Calegari T et al., 2005). Em nosso estudo observamos mais casos do sexo masculino positivos para o RSV em relação aos pacientes femininos, porém essa diferença foi mínima.

O RSV apresentou freqüência bem distinta nos meses de maio a julho, final do outono e início do inverno, coincidindo com o início da queda das temperaturas. A distribuição dos casos de RSV ao longo do ano seguiu um padrão intermediário ao de outros trabalhos no Brasil encontrado no Rio de Janeiro, onde a freqüência é maior nos meses de março, abril e maio (D'Elia C et al., 2005), e a região sul do Brasil que apresenta padrão semelhante ao de países de clima temperado, ou seja, freqüência maior nos meses de inverno e início da primavera (Stralliotto SM et al., 1995). Em Botucatu os meses de outono

caracterizam-se por queda constante da temperatura, com mínimas em julho. Outras áreas subtropicais apresentam esse mesmo padrão (Bosso PAR et al., 2004)

Há muito tempo é notado que a frequência do RSV é bem limitada a cinco meses do ano, aparentemente relacionada a eventos climáticos. No norte do país, área de clima equatorial, a pluviometria tende a ser o determinante climático para o aumento da frequência de RSV. Em regiões tropicais e subtropicais as temperaturas parecem ser o principal determinante climático (Cintra OA et al., 2001; Vieira RA et al., 2001). Mas como o pico de frequência de RSV não coincide com temperaturas mais baixas ou máxima ou mínima incidência de chuvas, propôs-se que a poluição seria uma possível determinante (Viera RA et al., 2002). Vírus respiratórios, em geral, são transmitidos via gotículas de saliva contendo vírus, entretanto o RSV necessita de contato direto ou indiretos para contágio, assim o comportamento humano tem um importante papel na sua transmissão (Omer SB et al., 2008; Calegari T et al., 2005). Torna-se difícil, então, determinar um fator que explicaria a sazonalidade do RSV, mais plausível é ver como algo multicausal, como baixa temperatura, chuvas, amplitude térmica, ou seja, fatores que tendem a manter pessoas agrupadas e em lugares fechados (Shek LPC et al., 2003). No ano de 2005 houve atípica queda de temperatura no mês de outubro resultando em um aumento no número de amostras mas não de casos de RSV, o que implica dizer que há outra variável anual mais decisiva na incidência do RSV.

Em relação aos sintomas mais encontrados nas crianças estudadas com detecção positiva para o RSV temos: tosse (93,47%), peito cheio (86,95%) e falta de ar (84,78%). Chiado também foi referido em 67,39% das infecções de RSV. Já está bem estabelecido que crianças com grave bronquiolite tem uma chance aumentada de desenvolver chiado recorrente pelo resto de sua vida. É sabido que crianças com chiado possuem chance aumentada de desenvolver asma pelo resto da vida e que infecções respiratórias virais continuam a ser a principal causa de chiado agudo na infância, além de colaborar para metade ou mais das hospitalizações por asma (Oh JW et al., 2006). Infecções virais podem induzir a

síntese de muitos fatores reguladores das vias aéreas e do desenvolvimento alveolar e assim remodelar as vias aéreas. Possivelmente a resposta inflamatória aguda junto ao esforço de reparar o dano viral ao tecido pulmonar parecem ter conseqüências a longo prazo na função pulmonar. A infância é caracterizada por multiplicação alveolar e remodelação das vias aéreas para acomodar o crescimento (Oh JW et al., 2006).

Em nosso trabalho, todas as amostras também foram testadas para RSV através de técnica de PCR. Os resultados encontrados foram muito parecidos aos já obtidos pela técnica de imunofluorescência indireta, para medir essa semelhança foi usado o teste estatístico “ κ ” de Cohen Kappa. Foi encontrado um índice κ de 0,82, entre o PCR e a imunofluorescência indireta para RSV, o que significa ótima concordância entre os dois métodos. Trabalhos semelhantes obtiveram índice κ de 0,85 (Vaz-de-lima et al., 2008) ou concordância perfeita entre os dois métodos (Bosso et al., 2004). Presume-se que amostras positivas em PCR e negativas para imunofluorescência o sejam devido a poucas células infectadas, mas ainda dentro do limiar de detecção para PCR. E que amostras negativas para PCR e positivas para imunofluorescência o sejam por possíveis fatores inibitórias na reação de PCR.

As infecções causadas por hMPV foram a segunda mais comum em nosso estudo (19 casos, 32,75% de todos os positivos ou 13,38% do total de amostras) valor um pouco maior que os 6,4% encontrado em Curitiba (do Carmo Debur M et al., 2007) e menor que 24,32% encontrados em Aracaju em 2003 (Cuevas LE et al., 2003), também dentro dos limites já encontrado em outros trabalhos (2,2% a 41%) (Stockton J et. al., 2002; Mahalingam S et al., 2006). Em relação às freqüências de hMPV, normalmente se encontra distribuição muito semelhante ao RSV durante o ano (Noyola DE et al., 2005; Maggi F et al., 2003; Principi N et al., 2005; Manoha C et al., 2006; Baer G et al., 2007). Em estudos de mais de um ano, não raro, encontra-se grande variação de um ano para outro, como Falsey et al., em 2003 encontrou variação de 1,5% a 7% em anos consecutivos, ou Maggi F et al., em 2003 com 7%, 3% e 13% em três anos consecutivos.

As faixas etárias dos casos de hMPV foram maiores que as encontradas nos casos de RSV, não diferente do que esta na literatura (do Carmo Debur M et al., 2007; Heikkinen T et al., Ordas J et al., 2006; Thomazelli LM et al., 2007).

Assim como em crianças com RSV, os parâmetros tosse, peito cheio e falta de ar foram os mais encontrados em crianças com hMPV esses três parâmetros também foram os mais comuns.

Quanto à sua distribuição, encontramos uma maior incidência nos períodos mais frios do ano, um pouco após o pico de RSV e com alguma incidência na primavera, o que está de acordo com a literatura, porém o hMPV apresenta uma distribuição muito mais espalhada, ao longo do ano, que o RSV (do Carmo Debur M et al., 2007; Jartti T et al., 2002; Cuevas LE et al., 2003). Nesse trabalho apenas 16,6% das amostras positivas para RSV foram coletadas fora do período maio-agosto, enquanto que para HMPV, 31,57% das amostras não foram do período maio-agosto.

Outros vírus, como influenza, parainfluenza e adenovírus, apresentaram frequência muito menor variando de 0,70% a 4,92%, valores também em acordo com a literatura (Freythuth F et al., 1997; Groandahl B et al., 2004). Nesse trabalho foi encontrado pelo menos uma amostra positiva para cada vírus pesquisado.

Infecções respiratórias agudas (IRAs) causadas por diferentes vírus podem requerer diferentes medidas de controle e tratamento, e ainda não é possível se distinguir apenas por parâmetros clínicos (Sung RY et al., 2008). Kuiken T et al., em 2004 em experimentos com *Macaca fascicularis* demonstrou que o hMPV possui patogenia muito semelhante a do RSV. Através de necropsias, verificou-se que tanto o sítio de infecção inicial como sua difusão se dá em células epiteliais respiratórias, assim como no RSV. Como o hMPV apresenta uma distribuição sazonal sobreposta à do RSV, isso potencialmente resulta em coinfeções. Em relação a sua frequência, há trabalhos que o apresentem como um evento raro (Viazov S et al., 2003). Outros sugerem o oposto (Greensill J et al., 2003; Maggi F et al., 2003; Cuevas LE et al., 2003).

Nesse trabalho foi encontrada HMPV em 22,03% das amostras positivas para RSV, um valor considerável.

Ainda assim o papel do hMPV como coinfectante não está claro. Numerosos trabalhos tratam desse assunto, porém sem um consenso. Há trabalhos que sugerem que essas coinfeções são mais graves que infecções causadas somente por RSV. Greensil et al, em 2003, encontrou, em seu estudo, que 70% das crianças, com RSV que recebiam auxílio respiratório, estavam também com o vírus hMPV, sugerindo que a coinfeção poderia agravar os casos de infecções respiratórias agudas. Semple et al., em 2005 observou que coinfeções aumentavam em dez vezes o risco relativo de admissão em UTIs pediátricas para ventilação mecânica. Outros trabalhos suportam essa hipótese (Vicente D et al., 2003; Esper F et al., 2004; Viazov S et al., 2003; König B et al., 2004; Papadopoulos NG et al., 2002;). Contrastando com essa idéia, outros trabalhos não encontraram relação entre coinfeção e aumento da gravidade da doença (Willians J et al., 2004; Xepapadaki P et al., 2004; van Woensel JB et al., 2006; Wolf DG et al., 2006; Garcia-Garcia ML et al., 2006). Nesse trabalho, dos 13 casos de coinfeções, 5 (38,46%) necessitaram de auxílio respiratório, contra 21 (45,65%) de RSV e 7 (77,77%) de hMPV indicando que coinfeção não necessariamente resulta em maior gravidade dos casos. Das duas mais graves características clínicas consideradas, apnéia foi mais encontrada em casos de coinfeções (38,46% dos casos) e obstrução do trato respiratório foi mais encontrado nos casos de RSV (78,26%), valor um pouco acima dos de outros trabalhos.

Também já foi reportado que coinfeções de RSV, hMPV e/ou rinovírus conferem um aumento de 5 a 10 vezes a gravidade da doença de crianças admitidas em UTIs. Mas há também outros trabalhos em que a coinfeção de dois vírus não aumenta significativamente a gravidade da doença (Pierangeli A et al., 2007). Em um trabalho de 2007 foi demonstrado que uma infecção de hMPV na infância é um dos mais significantes fatores de risco independentes no desenvolvimento da asma pré-escolar.(Garcia-Garcia ML et al., 2007).

O hMPV foi identificado pela primeira vez há oito anos e relacionado ao metapneumovírus aviário tipo C e em menor grau ao RSV (van den Hoogen BG et al., 2001). Desde então centenas de trabalhos foram publicados com esse vírus, usando uma grande diversidade de metodologias, tornando difícil determinar a real frequência das infecções de hMPV bem como sua importância médica em relação aos outros vírus respiratórios. A maioria dos estudos é realizada em crianças hospitalizadas, porém enquanto alguns trabalhos o fazem todas as amostras coletadas (Van Den Hoogen BG et al., 2003; Viazov S et al., 2003; Cuevas L et al., 2003; Boivin G et al., 2003), outros o fazem apenas nas amostras negativas para os outros vírus, ignorando a possibilidade de coinfeções, no entanto é sabido que se for realizado todos os testes de diagnósticos para uma amostra de uma pessoa com doença respiratória, o resultado será negativo para metade dos casos, não por não haver agente etiológico, e sim por haver um ainda não conhecido. Assim alguns trabalhos foram realizados estudando-se amostras estocadas e negativas para outros vírus testados, o que, por excluir as positivas para outros vírus, tende a subestimar sua frequência. (Vicente D et al., 2003; Esper F et al., 2003; Esper F et al., 2004; Freymuth F et al., 2004; Willians J et al., 2004; Galiano M et al., 2004) . Outra dificuldade para a comparação dos trabalhos é em relação à idade das crianças estudadas. O hMPV tem sido encontrado em crianças de todas as idades, no entanto, com uma frequência maior em crianças de até um ano de idade. Há trabalhos que incluem crianças menores de dois a três anos de idade (Vicente D et al., 2003; Van Den Hoogen BG et al., 2003; Viazov S et al., 2003; Maggi F et al., 2003; Cuevas LE et al., 2003), outras crianças menores de 5 anos (Esper F et al., 2003, Esper F et al., 2004; Galiano M et al., 2004), e outras crianças menores de 18 anos de idade (Jartti T et al., 2002; Freymouth F et al., 2003; Peiris J et al., 2003). Além disso, pode haver grandes diferenças nas frequências encontradas em um ano a outro como já foi demonstrado nos trabalhos de mais de um ano (Maggi F et al., 2003; Galiano M et al., 2004; Wilkesmann A et al., 2006). Outro parâmetro que causa confusão refere ao período de estudo. O hMPV, do ponto de vista epidemiológico, apresenta uma frequência sazonal semelhante ao RSV,

assim alguns trabalhos realizam a coleta de amostras durante apenas cinco meses em torno do pico de frequência do vírus, nesse trabalho encontrou-se 83,4% das amostras positivas de RSV no período maio-agosto e 68,4 das amostras de hMPV no mesmo período, essa diferença junto às variações de sazonalidade inerentes ao vírus podem facilmente subestimar sua importância médica. A maioria dos trabalhos com vírus respiratórios em crianças não é realizado para estudar infecções leves ou assintomáticas. Entretanto os trabalhos que estudaram essas infecções sugerem que, em tais casos, infecções por hMPV são muito raras em crianças jovens (Van den Hoogen BG et al., 2001; Van den Hoogen BG et al., 2003; Willians J et al., 2004).

Considerando-se que não é possível diferenciar uma infecção causada por um microorganismo ou outro, até mesmo diferenciar entre infecção bacteriana ou viral, somente pelas manifestações clínicas (D'Elia C et al., 2005), o uso de métodos de diagnóstico laboratoriais tornam-se fundamentais trazendo inúmeras vantagens. Dentre estas temos: o auxílio no prognóstico, ou seja, prever de acordo com os agentes etiológicos o tempo de hospitalização. Outra vantagem seria a do controle de infecções nosocomiais. Finalmente, devemos citar o uso eficiente de antibióticos (Templeton KE et al., 2007), onde na prática diária dos hospitais que não tem um diagnóstico de vírus de rotina implantado, é comum a administração de antibióticos mesmo em infecções onde a principal etiologia é viral. Além disso, devemos citar a expectativa por parte do paciente em receber um medicamento para controlar rapidamente a sua doença e a conseqüente pressão sobre os médicos para receitá-lo, muitas vezes notado como uma estratégia defensiva por parte dos médicos por não poderem confirmar de modo correto a real etiologia da infecção respiratória (File TM et al., 2002). O desenvolvimento de técnicas de amplificação de ácido nucléico, possibilitou diagnósticos mais rápidos, sensíveis e específicos permitindo um rápido retorno de informações aos médicos. Não menos importante, o fenômeno de resistência antimicrobiana é mundial e cada vez mais sério (WHO, 2009), sendo que um maior uso de diagnósticos rápidos e também de drogas antivirais, por si só, tende a fomentar o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e drogas

antivirais. Em conjunto esses resultados auxiliam no entendimento da importância desses patógenos, o que é importante no planejamento de políticas de promoção a saúde e vacinação.

6. Conclusões

Com base na população estudada concluímos que:

Pela reação de imunofluorescência indireta, o RSV foi o vírus mais freqüentemente encontrado, seguido em ordem decrescente pelos vírus da Parainfluenza 3, Influenza A, Adenovírus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 e Influenza B.

Pela reação de PCR o vírus RSV foi o vírus mais frequentemente detectado, seguido do hMPV.

O pico de detecção do vírus RSV pela reação de imunofluorescência e PCR ocorreu nos meses de maio e junho.

O pico de detecção do hMPV pela reação de PCR ocorreu nos meses de maio e junho.

A faixa etária mais acometida pelas infecções pelo RSV e hMPV no período estudado foi entre 0 e 6 meses.

7. Referências

Allander T. Human Bocavirus. *J Clin Virol.* 2008 Out; 41:29-33.

Baer G, Schaad UB, Heininger U. Clinical findings and unusual epidemiologic characteristics of human metapneumovirus infections in children in the region of Basel, Switzerland. *Eur J Pediatr.* 2008 Jan;167(1):63-69.

Bastien N, Ward D, Caesele P, Brandt K, Lee SH, McNabb G, Klisko B, Chan E, Li Y. Human metapneumovirus infection in the Canadian population. *J Clin Microbiol.* 2003 Out; 41(10): 4642-4646.

Boivin G, De Serres G, Côté S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, Bergeron MG, Déry P. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jun; 9(6):634-640.

Bosso PAR; Candeias JMG; Paduan KS; Ricchetti SMQ; Miranda AFM; Rugolo LMS; Durigon EL; Ventura AM. Human respiratory syncytial virus detection in children admitted at a community hospital in Botucatu, SP, Brazil *Braz. J. Microbiol.* 2004 Dez; 35(4).

Burton GEW, Engelkirk PG. Principais Doenças Infeciosas Humanas. In: Burton GEW, Engelkirk PG, autores. *Microbiologia para as Ciências da Saúde.* 5ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Editora Guanabara Koogan S.A.; 1998. p.203-252.

Calegari T, Queiroz DAO, Yokosawa J, Silveira HL, Costa LF, Oliveira TFM, Luiz LN, Oliveira RC, Diniz FC, Rossi LMG, Carvalho CJ, Lima AC, Mantese OC. Clinical-Epidemiological Evaluation of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children Attended in a Public Hospital in Midwestern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2005 Mar; 9(2): 156-161.

Carter J, Saunders V. Methods used in virology. In: Carter J, Saunders V. *Virology : principles and applications*. West Sussex, John Wiley & Sons Ltd; 2007. p. 9-28.

Cashat-Cruz M, Morales-Aguirre JJ, Mendoza-Azpiri M. Respiratory Tract Infections in Children in Developing Countries. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2005; 16: 84-92.

Chanock RM, Murphy BR, Collins PL. Parainfluenza Viruses. In: Fields BN, Peter M, Howley MD, Diane E, Griffin D, Robert A, et al. *Virology*. 4^a ed. Philadelphia, Knipe DM and Howley PM; 2001.

Chanock RM, Murphy BR, Collins PL. Respiratory Syncytial Virus. In: Fields BN, Peter M, Howley MD, Diane E, Griffin D, Robert A, et al. *Virology*. 4^a ed. Philadelphia, Knipe DM and Howley PM; 2001.

Cintra OA, Owa MA, Machado AA, Cervi MC, Figueiredo LT, Rocha GM, Siqueira MM, Arruda E. Occurrence and severity of infections caused by subgroup A and B respiratory syncytial virus in children in southeast Brazil. *J Med Virol*. 2001 Oct; 65(2): 408-412.

Couch RB. Rhinoviruses. In: Fields BN, Peter M, Howley MD, Diane E, Griffin D, Robert A, et al. *Virology*. 4^a ed. Philadelphia, Knipe DM and Howley PM; 2001.

Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2003 Dec; 9(12): 1626-1628

D'Elia C; Siqueira MM; Portes SA; Sant'Anna CC. Infecções do trato respiratório inferior pelo vírus sincicial respiratório em crianças hospitalizadas menores de um ano de idade. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2005 fev; 38(1): 7-10.

do Carmo Debur M, Bordignon J, Duarte dos Santos CN, Vidal LR, Nogueira MB, de Almeida SM, Raboni SM. Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. *J Clin Virol.* 2007 May; 39(1): 59-62.

Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics.* 2003 Jun; 111(6): 1407-1410.

Esper F, Martinello RA, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J Infect Dis.* 2004 Apr; 189(8): 1388-1396.

Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis.* 2003 Mar; 187(5): 785-790.
File TM Jr, Hadley JA. Rational use of antibiotics to treat respiratory tract infections. *Am J Manag Care.* 2002 Aug; 8(8): 713-727.

Flint ST, Racaniello VR, Enquist LW, Skalka AM, Krug RM. Viral Pathogenesis. In: Flint ST, Racaniello VR, Enquist LW, Skalka AM, Krug RM, autores. *Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis, and control.* Washington (DC): ASM Press; 2000. p.594-627.

Flint ST, Racaniello VR, Enquist LW, Skalka AM, Krug RM. Virus Cultivation, Detection, and Genetics. In: Flint ST, Racaniello VR, Enquist LW, Skalka AM,

Krug RM, autores. Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis, and control. Washington (DC): ASM Press; 2000. p.24-56.

Freymuth F, Vabret A, Galateau-Salle F, Ferey J, Eugene G, Petitjean J, Gennetay E, Brouard J, Jokik M, Duhamel JF, Guillois B. Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. Clin Diagn Virol. 1997 May; 8(1): 31-40.

Freymuth F, Vabret A, Legrand L, Eterradossi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, Guillois B. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. Pediatr Infect Dis J. 2003 Jan; 22(1): 92-94.

Gagliardi TB, Iwamoto MA, Paula FE, Proença-Modena JL, Saranzo AM, Criado MF, et al. Human bocavirus respiratory infections in children. Epidemiol. Infect, 2008 Dez; 1-5.

García-García ML, Calvo C, Casas I, Bracamonte T, Rellán A, Gozalo F, Tenorio T, Pérez-Breña P. Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5. Pediatr Pulmonol. 2007 May; 42(5): 458-464.

García-García ML, Calvo C, Martín F, Pérez-Breña P, Acosta B, Casas I. Human metapneumovirus infections in hospitalised infants in Spain. Arch Dis Child. 2006 Apr; 91(4): 290-295.

Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. Am J Dis Child. 1986 jun; 140(6): 543-546.

Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis.* 2003 Mar; 9(3): 372-375.

Gröndahl B, Puppe W, Weigl J, Schmitt HJ. Comparison of the BD Directigen Flu A+B Kit and the Abbott TestPack RSV with a multiplex RT-PCR ELISA for rapid detection of influenza viruses and respiratory syncytial virus. *Clin Microbiol Infect.* 2005 Oct; 11(10): 848-850.

Han LL, Alexander JP, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. *J Infect Dis.* 1999 Jan; 179(1) : 25-30.

Heikkinen T, Salmi AA, Ruuskanen O Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for detection of influenza. *BMJ.* 2001 Jan; 322(7279): 138.

Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol.* 1991 Jun; 133(11): 1135-1151.

Holmes KV. Coronaviruses. In: Fields BN, Peter M, Howley MD, Diane E, Griffin D, Robert A, et al. *Virology.* 4^a ed. Philadelphia, Knipe DM and Howley PM; 2001.

International Conference on Acute Respiratory Infections. Acute Respiratory infections: The forgotten Pandemic. *INT J TUBERC DIS.* 1997 Jul; 2(1): 2-4.

Jartti T, van den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet.* 2002 Nov ;360(9343): 1393-1394.

Kahn JS. Newly discovered respiratory viruses: significance and implications. *Curr Opin Pharmacol*. 2007 Jul; 7: 478-483.

Kuiken T, Hoogen BG, Riel DA, Laman JD, Amerongen G, Sprong L, Fouchier RA, Osterhaus AD. Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract. *Am J Pathol*. 2004 Jul; 164(6): 1893-1900.

Lamb RA, Kalakofsky D. Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication In: Fields BN, Peter M, Howley MD, Diane E, Griffin D, Robert A, et al. *Virology*. 4^a ed. Philadelphia, Knipe DM and Howley PM; 2001.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977 Mar; 33(1): 159-174.

Madeley CR, Peiris JS. Methods in virus diagnosis: immunofluorescence revisited. *J Clin Virol*. 2002 Aug;25(2): 121-134.

Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, Lanini L, Andreoli E, Ragazzo V, Pistello M, Specter S, Bendinelli M. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul; 41(7): 2987-2991.

Mahalingam S, Schwarze J, Zaid A, Nissen M, Sloots T, Tauro S, Storer J, Alvarez R, Tripp RA. Perspective on the host response to human metapneumovirus infection: what can we learn from respiratory syncytial virus infections? *Microbes Infect*. 2006 Jan; 8(1): 285-293.

Manoha C, Espinosa S, Aho SL, Huet F, Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J Clin Virol*. 2007 Mar; 38(3): 221-226.

Noyola DE, Alpuche-Solís AG, Herrera-Díaz A, Soria-Guerra RE, Sánchez-Alvarado J, López-Revilla R. Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics. *J Med Microbiol*. 2005 Oct; 54(10): 969-974.

Oh JW. Respiratory viral infections and early asthma in childhood. *Allergol Int*. 2006 Dec; 55(4): 369-372.

Omer SB, Sutanto A, Sarwo H, Linehan M, Djelantik IG, Mercer D, Moniaga V, Moulton LH, Widjaya A, Muljati P, Gessner BD, Steinhoff MC. Climatic, temporal, and geographic characteristics of respiratory syncytial virus disease in a tropical island population. *Epidemiol Infect*. 2008 Oct; 136(10): 1319-1927.

Ordás J, Boga JA, Alvarez-Argüelles M, Villa L, Rodríguez-Dehli C, de Oña M, Rodríguez J, Melón S. Role of metapneumovirus in viral respiratory infections in young children *J Clin Microbiol*. 2006 Aug; 44(8): 2739-2742.

Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsofia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, Gourgiotis D, Kafetzis D. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 May ; 165(9): 1285-1289.

Pecchini R, Berezin EN, Felício MCC, Passos SD, Souza MCO, Vaz de Lima LRA, Ueda M, Matsumoto TK, Durigon EL. Incidence and Clinical Characteristics of the Infection by the Respiratory Syncytial Virus in Children Admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. *Braz J Infect Dis*. 2008 Oct; 12(6): 476-479.

Peiris JS, Tang WH, Chan KH, Khong PL, Guan Y, Lau YL, Chiu SS. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jun; 9(6): 628-633.

Peret TC, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus AD, Erdman DD, Anderson LJ. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis.* 2002 Jun; 185(11): 1660-1663.

Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, Tsou C, Anderson LJ. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis.* 2000 Jun; 181(6): 1891-1896.

Pierangeli A, Gentile M, Di Marco P, Pagnotti P, Scagnolari C, Trombetti S, Lo Russo L, Tromba V, Moretti C, Midulla F, Antonelli G. Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *J Med Virol.* 2007 Apr; 79(4): 463-468.

Principi N, Bosis S, Esposito S. Human metapneumovirus in paediatric patients. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Apr; 12(4): 301-308.

RÁCZ ML. Adenovírus. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editors. *Microbiologia.* 4^a ed. São Paulo (SP): Editora Atheneu; 2004. p.587-590.

RÁCZ ML. Diagnóstico Laboratorial das infecções Virais. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editors. *Microbiologia.* 4^a ed. São Paulo (SP): Editora Atheneu; 2004. p.553-564.

RÁCZ ML. Ortomixovírus. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editors. *Microbiologia.* 4^a ed. São Paulo (SP): Editora Atheneu; 2004. p.621-625.

RÁCZ ML. Paramixovírus. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editors. *Microbiologia*. 4^a ed. São Paulo (SP): Editora Atheneu; 2004. p.631-637.

RÁCZ ML. Picornavírus. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editors. *Microbiologia*. 4^a ed. São Paulo (SP): Editora Atheneu; 2004. p.641-646.

Ricchetto AGL, Ribeiro JD, da Silva MTN, Almeida RS, Arns CW, Baracat ECE. Respiratory Syncytial Virus (RSV) in Infants Hospitalized for Acute Lower Respiratory Tract Disease: Incidence and Associated Risks. *Braz J Infect Dis*. 2006 Sep; 10(5): 357-361.

Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, Shears P, Smyth RL, Hart CA. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2005 Feb; 191(3): 382-386.

Shek LP, Lee BW. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. *Paediatr Respir Rev*. 2003 Jun; 4(2): 105-111.

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

Storch GA. Diagnostic Virology. In: Fields BN, Peter M, Howley MD, Diane E, Griffin D, Robert A, et al. *Virology*. 4^a ed. Philadelphia, Knipe DM and Howley PM; 2001.

Stralioatto SM, Nestor SM, Siqueira MM. Respiratory Syncytial Virus Groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2001 fev; 96(2): 155-158.

Sung RY, Chan PK, Choi KC, Yeung AC, Li AM, Tang JW, Ip M, Tsen T, Nelson EA. Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for diagnosis of acute viral respiratory infection. *J Clin Microbiol.* 2008 Sep; 46(9): 3073-3076.

Templeton KE. Why diagnose respiratory viral infection? *J Clin Virol.* 2007; 40(1): S2-S4.

Thomazelli LM et al., 2007. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in Southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J).* 2007 Sep-Oct; 83(5): 422-428.

Tortora JT, Funke BR, Case CL. Doenças Microbianas do Sistema Respiratório. In: Tortora JT, Funke BR, Case CL, autores. *Microbiologia.* 8^a ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2005. p.675-704.

van den Hoogen BG , Jong JC, Groen J, Kuiken T, Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 2001 Jun; 7(6): 719-724.

van Woensel JB, Bos AP, Lutter R, Rossen JW, Schuurman R. Absence of human metapneumovirus co-infection in cases of severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Pulmonol.* 2006 Sep; 41(9): 872-874.

Vaz-de-Lima LR, Souza MC, Matsumoto T, Hong MA, Salgado MM, Barbosa ML, Sato NS, Requejo HI, Oliveira CA, Pecchini R, Berezin E, Passos SD, Schvartsman C, Pasmanick A, Durigon EL, Ueda M. Performance of indirect immunofluorescence assay, immunochromatography assay and reverse transcription-polymerase chain reaction for detecting human respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirate samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Aug; 103(5): 463-467.

Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol.* 2003 Jul; 41(7): 3043-3045.

Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Trallero E. Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children. *Emerg Infect Dis.* 2003 May; 9(5): 602-603.

Vieira RA, Diniz EM, Vaz FA. Clinical and laboratory study of newborns with lower respiratory tract infection due to respiratory viruses. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003 May; 13(5): 341-350.

WHO | Acute respiratory diseases in children. Geneva. World Health Organization: 2009 set. Disponível em: http://www.who.int/fch/depts/cah/resp_infections/en/

WHO | Acute respiratory diseases in children. Geneva. World Health Organization: 2009 set. Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index.html

WHO | Acute respiratory diseases in children. Geneva. World Health Organization: 2009 set. Disponível em: http://www.who.int/topics/drug_resistance/en/

Wilkesmann A, Schildgen O, Eis-Hübinger AM, Geikowski T, Glatzel T, Lentze MJ, Bode U, Simon A. Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *Eur J Pediatr.* 2006 Jul; 165(7): 467-475.

Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE Jr. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med.* 2004 Jan 29; 350(5): 443-450.

Wolf DG, Greenberg D, Kalkstein D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Saleh N, Goldberg MD, Dagan R. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. *Pediatr Infect Dis J.* 2006 Apr; 25(4): 320-324.

Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Peter M, Howley MD, Diane E, Griffin D, Robert A, et al. *Virology.* 4^a ed. Philadelphia, Knipe DM and Howley PM; 2001.

Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, Tsolia M, Gourgiotis D, Liapi-Adamidou G, Constantopoulos AG, Kafetzis D, Papadopoulos NG. Human Metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. *J Clin Virol.* 2004 Jul; 30(3): 267-270.

Zheng H, Peret TC, Randolph VB, Crowley JC, Anderson LJ. Strain-specific reverse transcriptase PCR assay: means to distinguish candidate vaccine from wild-type strains of respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol.* 1996 Feb; 34(2): 334-337.

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

PESQUISA DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS, COM ÊNFASE PARA O VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL (RSV) E METAPNEUMOVÍRUS HUMANO EM CRIANÇAS ATENDIDAS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FMB, UNESP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,....., responsável pelo menor..... estou sendo informado(a) e esclarecido(a) sobre a importância dos micróbios que causam infecção pulmonar e dificuldade respiratória nas crianças, às vezes tão grave que precisam ser internadas, receber oxigênio ou outro tipo de assistência respiratória e até podem necessitar de UTI.

Esses micróbios podem ser bactérias ou vírus, que causam uma doença muito parecida, só que o tratamento é diferente. Para diferenciar estes 2 micróbios alguns exames ajudam, como o R-X de tórax e o exame de sangue.

Dentre os vírus mais frequentes em crianças pequenas temos o vírus sincicial respiratório e o metapneumovírus humano.

Neste estudo queremos saber se estes dois vírus podem ser encontrado com frequência nas crianças menores de 5 anos de idade atendidas em nosso Hospital com problemas respiratórios.

Para pesquisar se a criança tem o vírus colheremos a secreção de nasofaringe através de aspiração e "swab" de nariz, para fazer a pesquisa do vírus. Ressaltamos não haver nenhum risco envolvido neste procedimento. O material coletado será estocado em freezer e poderá ser usado em estudos posteriores para a pesquisa de outros agentes virais envolvidos em quadros clínicos respiratórios.

Estou ciente de que se meu filho(a) não participar deste estudo ele(a) receberá toda assistência que for necessária para seu tratamento e caso eu consinta com a participação no

estudo, posso solicitar e obter informações sobre a natureza do estudo, posso retirar o consentimento a qualquer momento e isto não irá interferir no tratamento oferecido ao meu filho (a). Concordo que as informações obtidas neste estudo sejam divulgadas, desde que a identidade da criança não seja revelada .

Após ter sido suficientemente esclarecido(a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto de livre e espontânea vontade em participar deste estudo.

Botucatu,, dede 20.....

Assinatura do responsável legal

Assinatura do pesquisador

Pesquisador responsável pelo Projeto

João Manuel Grisi Candeias
Rua Dr. Luiz Ayres, 485
18607-020 - Botucatu – SP
tel: (014)3815-7254
email: candeias@ibb.unesp.br

Pesquisador médico responsável

Joelma Gonçalves Martin
Rua Augusto dos Reis, 397
18601-061 – Botucatu - SP
tel: (014)3813-3941
email: colaute@uol.com.br

Anexo 2

PROJETO DIVERSIDADE GENÉTICA VIRAL – VÍRUS RESPIRATÓRIOS PROTOCOLO CLÍNICO – COMUNIDADE/AMBULATÓRIO

Nome do paciente: _____

Data do atendimento: ___/___/_____ Número do caso: _____

Número Registro Hospitalar: _____ Hospital: _____

Nome da mãe ou responsável: _____

Data de nascimento: ___/___/_____ Sexo: () F () M Raça: () B () N () A () Outras

EXAME FÍSICO

Peso	
Estatura	
EGeral	() BEG () REG () MEG
febre	() 5 () N T.max=
sibilos	() 5 () N
Roncos	() 5 () N
Dispneia	() 5 () N
Cianose	() 5 () N
Tiragens	() 5 () N
Bat. asas de nariz	() 5 () N
Apnéia	() 5 () N
Freq. respiratória	
Freq. cardíaca	
Saturação de O2	
Otoscopia alterada	() 5 () N
Orofaringe alterada	() 5 () N

História clínica:	tempo de duração (horas/dias)
Tosse () s () n	
Coriza () s () n	
Espirros () s () n	
Febre () s () n	Tmax=
Chiado no peito () s () n	
Peito cheio () s () n	
Falta de ar () s () n	
Apnéia () s () n	
Obstrução nasal () s () n	
Outras queixas:	

Outros achados:

Antecedentes Pessoais:

- () asma () rinite () eczema () DRGE () cardiopatia () neuropatia () prematuridade
 () O2 neonatal () BDP () F.Cística () HIV () outras imunodeficiências () tuberculose
 () outros _____ () episódios prévios de chiado

Idade do desmame: . _____

Antecedentes Familiares:

- () asma () rinite () tuberculose (com contato) () dermatite () fumo passivo

DIAGNÓSTICO: _____

CONDUTA MÉDICA: _____

Projeto Diversidade Genética - Vírus Respiratórios

PROTOCOLO CLÍNICO - HOSPITAL

Nome do paciente: _____
 Data do atendimento: ____/____/____ Número do caso: _____
 Número Registro Hospitalar: _____ Hospital: _____
 Nome da mãe ou responsável: _____
 Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: () F () M
 Raça: () B () N () A () Outra

HISTÓRIA CLÍNICA	TEMPO DE DURAÇÃO (horas/dias)
Tosse () S () N	
Coriza () S () N	
Espirros () S () N	
Febre () S () N	
Chiado no peito () S () N	
Peito cheio () S () N	
Falta de ar () S () N	
Apnéia () S () N	
Obstrução nasal () s () n	
Outras queixas () S () N	

Peso	
Estatura	
EGeneral	() BEG () REG () MEG
Febre	() S () N
Sibilos	() S () N
Roncos	() S () N
Dispneia	() S () N
Cianose	() S () N
Tiragens	() S () N
Bat. Asas de nariz	() S () N
Apneia	() S () N
Freq. Respiratória	
Freq. Cardíaca	
Saturação de O2	
Otoscopia alterada	() S () N
Orofaringe alterada	() S () N

Outras queixas: _____

Idade do desmame: _____

Antecedentes familiares: () Asma () Rinite () Tuberculose com contato

Existem outras pessoas com algum destes sintomas no domicílio? () S () N

Qual o grau de parentesco? _____

DIAGNÓSTICO ATUAL: _____

Observações: _____

PACIENTES HOSPITALIZADOS:
 Data da admissão: ___/___/___ Data de alta: ___/___/___
 Diagnóstico de alta: _____
 Diagnóstico de internação: _____
 Dados da evolução clínica durante a hospitalização: (ver tabela anexa)
 Medicamentos prescritos durante a internação: (não incluir os que estão na tabela)
 () aminofilina () beta2 ev () drogas anti DRGE () antiviral () antibiótico (qual? _____)
 Antecedentes Pessoais:
 () Asma () rinite () eczema () DRGE () cardiopatia () neuropatia () O2 neonatal () BDP () F.Cística () HIV () outras imunodeficiências () tuberculose () outros _____ () episódios prévios de chiado
 Idade do desmame: _____
 Antecedentes Familiares:
 () asma () rinite () tuberculose (com contato) () dermatite () fumo passivo

CONTROLE DIÁRIO DE PACIENTES HOSPITALIZADOS

	Data		Data		Data		Data		Data		Data	
	D	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D	N
FResp												
Temperatura*												
Oximetria*												
O2 sem vent.												
Mecânica												
V.Mec**												
V.Mec Nl**												
Antibiót.***												
Cort.****												
Beta-adren. Inalat												
Bromo de ipratropium												
Nutrição (pausa/oral/sonda/parental)												

Obs : D = período diurno (anotar a noite os dados das 6 h as 18 h
 N = período noturno (anotar pela manhã os dados das 18h do dia anterior as 6h da manhã)
 * anotar os piores valores do período
 ** colocar um X no campo correspondente quando estiver em uso
 *** anotar o nome do antibiótico no campo correspondente quando em uso
 **** Corticosteroide: quando em uso, anotar a via de administração: VO, IM ou EV