



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**RINOVÍRUS HUMANO EM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS
EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS DE IDADE: FATORES
ENVOLVIDOS NO AGRAVAMENTO DA DOENÇA**

Lourenço Faria Costa

**Uberlândia, MG
Fevereiro de 2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**RINOVÍRUS HUMANO EM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS
EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS DE IDADE: FATORES
ENVOLVIDOS NO AGRAVAMENTO DA DOENÇA**

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor

Aluno: Lourenço Faria Costa

Orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

Uberlândia, MG
Fevereiro de 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C837r Costa, Lourenço Faria, 1976-
2012 Rinovírus humano em infecções respiratórias agudas em crianças menores de cinco anos de idade : fatores envolvidos no agravamento da doença / Lourenço Faria Costa. -- 2012.
70 f. : il.

Orientador: Jonny Yokosawa.

Co-orientador: Carlos Ueira-Vieira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Infecções respiratórias em crianças - Teses. I. Yokosawa, Jonny. II. Vieira, Carlos Ueira, 1981- . III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**RINOVÍRUS HUMANO EM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS EM
CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS DE IDADE: FATORES
ENVOLVIDOS NO AGRAVAMENTO DA DOENÇA**

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Prof. Dr. Jonny Yokosawa
UFU – Uberlândia, MG

Prof. Dr. Miguel Tanus Jorge
UFU – Uberlândia, MG

Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia
UFU – Uberlândia, MG

Prof. Dr. João Manuel Grisi Candeias
UNESP – Botucatu, SP

Prof. Dr. Fernando Couto Motta
FIOCRUZ – Rio de Janeiro, RJ

Suplentes:

Profa. Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro
UFU – Uberlândia, MG

Prof. Dr. André Luiz Domingues
UFTM – Uberaba, MG

Dedico este trabalho a todas as crianças que participaram deste estudo. Elas são o propósito fundamental deste estudo, muito mais do que minha formação acadêmica e pessoal. Para cada amostra, houve uma criança enferma e também meu profundo e mais sincero desejo de que encontrem ou tenham encontrado o alívio para seu sofrimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as orientações e contribuições que recebi ao longo de minha “carreira” acadêmica, incluindo todos os meus professores e principalmente àqueles que participaram incisivamente na condução, orientação efetiva e finalização deste trabalho: prof. Jonny Yokosawa, que me orientou a maior parte do tempo, mesmo quando sua orientação ainda não estava formalizada; prof. Carlos Ueira-Vieira que me deu devido suporte e auxílio para o desenvolvimento dos experimentos e sempre esteve presente para me ajudar de maneira muito cordial; e profa. Divina Queiróz, que deu a ideia que originou este trabalho.

Agradeço à Tamires do Laboratório de Nanobiotecnologia (INGEB/UFU) pelo sequenciamento das amostras e, dessa forma, por oferecer com muita cordialidade e competência uma valiosa contribuição para este estudo.

Agradeço aos Laboratórios de Parasitologia e Imunologia, por permitirem a utilização do freezer -70°C onde as amostras ficaram estocadas, e ao Laboratório de Fisiologia pelo espaço cedido para as reações de (RT-)PCR.

Também agradeço a Thelma Oliveira e ao Guilherme Freitas, cujo companheirismo de longa data, seriedade, competência e ética com certeza me serviram de lição não apenas para o desempenho de meus estudos, mas para a vida. Agradeço à profa. Juliana pelo grande incentivo e pelos conselhos.

Agradeço aos alunos e ex-alunos de graduação do Laboratório de Virologia Aline Tolardo, Lorraine Polloni, Heber Barros, Edigar Dias, Flávia Vieira e Rafaela tostes, pela valiosa oportunidade que me deram de aprender a ensinar. Agradeço à Nayhanne Paula pelo início do trabalho com os HRV que originou esta tese e ao Bruno Carneiro que me ajudou a dar os primeiros passos com a PCR.

Agradeço a todos os pais que autorizaram a coleta das amostras e que, com isso, contribuíram de forma muito valiosa para este estudo. Aos médicos que atenderam as crianças, principalmente ao Dr. Hélio Silveira, que também se dedicou às definições clínicas e sempre me auxiliou com muita presteza na parte clínica do estudo. Agradeço a todos os enfermeiros que participaram da coleta das amostras clínicas. Agradeço à Elvira do setor de prontuário médico do HC, não apenas pela presteza de seus serviços, mas também pela gentileza e compreensão que vão além de suas atribuições funcionais.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, incluindo as secretárias Lucélia e Lucileide e os (ex e atual) coordenadores

do Programa e ao Instituto de Ciências Biomédicas, pelos auxílios concedidos na aquisição de materiais e na participação dos congressos, além de todas as instituições de fomento que possibilitaram a aquisição dos equipamentos e reagentes utilizados neste estudo. Agradeço à instituição que proveu minha bolsa de estudos durante esses quatro anos, a CAPES.

Agradeço profundamente à minha esposa Marcela, pela paciência, compreensão, companheirismo, amor, carinho, por (sempre) cuidar de mim, por me ensinar, por suportar e conviver com meus defeitos (muito mais do que qualquer outra pessoa) e também por ter comprado um notebook pra mim (mesmo eu não querendo ter um...mas que foi muito útil pra terminar a tese e organizar meus mp3, o que também é muito importante). Agradeço a meu sogro Fisao, cunhados Binho, Renato e Edu (dois deles sendo chatos), sobrinhas Alana e Carol e concunhadas Adriana, Lisani e Ana, por sempre me trataram tão bem, me provendo assim o devido descanso para continuar com mais ânimo esta tese.

Agradeço a todos meus amigos, incluindo Marcus, Daniel, Squash e Sérgio, que também contribuíram muito para o meu bem estar, principalmente nas fases difíceis, e que me fizeram ter a certeza de que eu podia contar com todos eles.

Agradeço a meu pai Heli e minha mãe Joana; agradeço a minha tia Eni e minhas primas Branca, Paula e Andressa, fundamentalmente pelo cuidado, paciência, amor, carinho e dedicação que elas tiveram com a vó nos últimos e mais difíceis momentos, o que me deu um grande sopro de vitalidade e esperança para continuar seguindo com meu doutorado apesar das grandes dificuldades e problemas pessoais.

Agradeço a vó Alice pela lição de vida. Ela me mostrou o que eu acredito ser a verdadeira concepção de dificuldade, pois com ela aprendi que existem coisas muito mais difíceis do que fazer uma tese, como passar pelo sofrimento que ela passou, ter que me despedir e lidar com a saudade. Agradeço também, fundamentalmente, por ela ter me mostrado que mesmo diante de uma grande dificuldade e sofrimento, tudo pode ser enfrentado com serenidade e ternura. Por isso não dedico a ela esta tese, mas sim cada dia de minha vida, na tentativa de fazer merecê-la e para que eu possa ser pelo menos um pouco mais parecido com ela, a cada dia.

LISTA DE ABREVIACÕES

AdV: adenovírus

ENF: enfermaria

HC/UFU: Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

hMPV: metapneumovírus humano

HRV: rinovírus humano

IFI: imunofluorescência indireta

IRA: infecção respiratória aguda

PAP: pronto atendimento pediátrico

PIV: vírus parainfluenza

PS: pronto socorro

RT-PCR: transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase

TRI: trato respiratório inferior

TRS: trato respiratório superior

UTI: unidade de terapia intensiva

VRS: vírus respiratório sincicial

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Eletromicrografia do HRV	03
FIGURA 2 – Organização genômica dos HRV	04
FIGURA 3 – Mapa da localização aproximada dos oligonucleotídeos	18
FIGURA 4 – Distribuição do número de casos de vírus respiratórios	24
FIGURA 5 – Distribuição de casos relacionados à gravidade e tipo de sintomas clínicos	26
FIGURA 6 – Distribuição de casos de acordo com presença de fatores de risco.....	28
FIGURA 7 – Distribuição de casos de acordo com os tipos de fatores de risco	30
FIGURA 8 – Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos	31
FIGURA 9 – Árvore filogenética das sequências deduzidas de aminoácidos	33
FIGURA 10 – Distribuição de casos das espécies de HRV de acordo a gravidade dos sintomas	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para as reações de RT-PCR e sequenciamento 17

TABELA 2 – Características demográficas das crianças com infecções respiratórias agudas virais 23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Características dos rinovírus	02
1.2. Estrutura viral/genômica, replicação e caracterização molecular dos HRV	03
1.3. Epidemiologia.....	06
1.4. Patogênese e sintomas clínicos.....	07
1.5. Co-infecções.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Pacientes e locais de atendimento.....	13
3.2. Critérios clínicos e gravidade dos sintomas.....	14
3.3. Fatores de risco para o agravamento das IRAs.....	15
3.4. Coleta, processamento e estocagem das amostras.....	25
3.5. Imunofluorescência indireta.....	16
3.6. Extração de RNA.....	16
3.7. Oligonucleotídeos utilizados para síntese do DNA complementar (cDNA), PCR e sequenciamento.....	17
3.7.1. Síntese do cDNA.....	18
3.7.2. Reações em cadeia da polimerase.....	18
3.7.3. Visualização dos produtos amplificados em gel de agarose.....	19
3.7.4. Sequenciamento.....	19
3.7.5. Edição, alinhamento das sequências e análise filogenética.....	20
3.8. RT-PCR para detecção de outros vírus respiratórios.....	20
3.9. Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÕES.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
8. ANEXOS.....	57

RESUMO

Apesar dos rinovírus humanos (HRV) serem mais relacionados com resfriado comum, esses agentes também estão associados com infecções respiratórias graves. Os possíveis fatores que levariam ao agravamento das doenças respiratórias pelos HRV foram investigados neste estudo, assim como a frequência desses vírus. A IFI e/ou RT-PCR foram utilizadas para testar 434 aspirados de nasofaringe de crianças menores de cinco anos de idade para identificar a presença do HRV, juntamente com vírus respiratório sincicial (VRS), vírus influenza, vírus parainfluenza, adenovírus e metapneumovírus. As espécies dos HRV foram identificadas através da análise da região genômica VP4. Pelo menos um vírus foi detectado em 383 amostras, sendo o HRV identificado em 181 (41,7%) amostras: 107 como único agente e 74 em co-infecções. A proporção de infecções moderadas a graves em relação às brandas, em infecções simples, aumentou comparando-se com co-infecções ($p=0,0070$). Entretanto, o VRS é reconhecidamente um agente causador de doenças respiratórias graves em crianças, sendo encontrado em 32 co-infecções com os HRV. Removendo esses casos, as infecções moderadas a graves foram reduzidas para 35,7% (15/42), o que foi similar com a frequência encontrada em infecções simples pelos HRV. Resultados similares foram observados para os tipos de sintomas, onde para os HRV predominou sintomas do TRS, embora houvesse um número significativo de casos de bronquiolite, pneumonia e bronquite sibilante. A presença de fatores de risco, incluindo tenra idade, prematuridade, doenças respiratórias não infecciosas e principalmente doenças congênitas cardíacas em infecções simples, aumentou de 46,6% (34/73) em casos brandos para 79,4% (27/34) em infecções moderadas a graves em infecções simples pelos HRV ($p=0,0014$). Das 42 espécies identificadas, os HRV A e C apresentaram proporções e gravidade clínica similares. Dois enterovírus, um poliovírus e um echovírus, também foram identificados. Nossos resultados mostraram que apesar dos HRV estarem relacionados principalmente com casos de doença branda, esses vírus foram muito frequentes e relacionados com uma quantidade significativa de casos moderados a graves em infecções simples. A presença de um segundo vírus respiratório, com exceção do VRS, pode não estar associada com um aumento da gravidade clínica, o que pode estar mais relacionado presença de fatores de risco. Em adição, não foi constatado maior gravidade dos sintomas pelo HRV relacionado à espécie. Chamamos a atenção para a possibilidade de detecção de enterovírus através do uso da RT-PCR, enfatizando a importância da caracterização molecular dos HRV. Futuramente, outros fatores de risco poderiam ser incluídos para avaliação mais detalhada das causas do paciente que poderiam levar a doenças mais graves frente a infecções pelos HRV, além de ampliar o estudo de caracterização molecular desses vírus através do aumento do número de amostras sequenciadas.

Palavras-chave: rinovírus humano, co-infecção, fatores de risco, caracterização molecular

ABSTRACT

Although human rhinoviruses (HRV) have been shown to cause common cold, they are increasingly found in severe respiratory infections. Whether or not disease severity may be increased by the presence of a second virus or comorbidities was investigated, such as the HRV frequency. By using IFA and/or RT-PCR we tested 434 nasopharyngeal aspirates from children less than five years old presenting acute respiratory disease for presence of HRV, respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus, parainfluenza virus, adenovirus and human metapneumovirus. HRV was characterized through VP4 genome analysis. Thus, at least one virus was detected in 384 samples and HRV was detected in 181 (41.7%) samples: in 107 as the single agent and in 74 with another virus. Moderate-to-severe cases rose significantly in co-infections ($p=0.0070$). However, RSV, which causes severe disease, was found in 32 co-infections. By removing these cases, moderate-to-severe cases in co-infections reduced to 35.7% (15/42), which is similar to the frequency found in single infections. Similar results was observed according to symptoms, in which URT involvement predominated in HRV single infections. Nevertheless, HRV was responsible for a considerable number of bronchiolitis and wheezing symptoms. Presence of comorbidities, specially early age, prematurity and congenital heart diseases, in single infections rose from 46.6% (34/73) in mild cases to 79.4% (27/34) in moderate-to-severe cases ($p=0.0014$). From 42 characterized HRV species, HRV-A and HRV-C presented similar proportions (21 and 19, respectively) with no difference of clinical severity. Two enterovirus, poliovirus and echovirus, were also identified. Despite HRV was related mostly with mild symptoms, our results showed that HRV were a very frequent respiratory agent found in many moderate-to-severe cases. The presence of another virus, except for RSV, may not be associated with increased disease severity, which may rather be caused by presence of comorbidities and by the HRV infection itself. We also did not found relation of increasing disease severity according to specie. Finally, we call attention for the possibility of enterovirus detection in RT-PCR HRV investigation, emphasizing the importance of molecular characterization of HRV. Further efforts must be done in attempt to include breast feeding and atopic diseases in parents to accurately evaluate other risk factors of developing severe respiratory disease by HRV infections, and include more samples in the molecular characterization of these agents.

Key words: human rhinovirus, co-infection, risk factors, molecular characterization

1. INTRODUÇÃO

Infecções respiratórias agudas virais representam um grande impacto socioeconômico em populações de todo mundo, afetando indivíduos de todas as idades, principalmente crianças (MONTÓ, 2002; FENDRICK, MONTÓ *et al.*, 2003). Os rinovírus humanos (HRV), apesar de estarem tipicamente associados a doenças respiratórias brandas e autolimitadas, constituem um dos principais agentes responsáveis por esse impacto, seja relacionado ao elevado número de prescrições inadequadas de medicamentos, ou em decorrência da elevada frequência de infecções que esses vírus causam, podendo inclusive provocar sintomas clínicos graves (ROTBART e HAYDEN, 2000; BERTINO, 2002; HEIKKINEN e JARVINEN, 2003; ARDEN, MCERLEAN *et al.*, 2006; SHARFSTEIN, NORTH *et al.*, 2007; RUOHOLA, WARIS *et al.*, 2009; FAIRCHOK, MARTIN *et al.*, 2010; WATANABE, CARRARO *et al.*, 2010; BROBERG, NIEMELA *et al.*, 2011; MILLER, WILLIAMS *et al.*, 2011).

Dentre os vírus respiratórios, os HRV apresentam a maior diversidade de sorotipos conhecida (mais de 100) e são mundialmente distribuídos (BRIESE, RENWICK *et al.*, 2008). Esses vírus também acarretam uma ampla variedade de sintomas clínicos, envolvendo tanto o trato respiratório superior (TRS) quanto o inferior (TRI) (HEIKKINEN e JARVINEN, 2003; HAYDEN, 2004).

Apesar desses vírus terem sido descobertos na década de 50 (PRICE, 1956), sua melhor caracterização clínica e molecular e, conseqüentemente, uma avaliação mais detalhada de seu impacto epidemiológico, só foi possível mais de trinta anos depois, com o advento de técnicas moleculares para sua detecção (GAMA, HUGHES *et al.*, 1988; GAMA, HORSNELL *et al.*, 1989). Dada a dificuldade de se isolar os rinovírus em linhagens celulares, a RT-PCR permitiu a detecção rápida de uma ampla gama de sorotipos virais. Dentro deste contexto, os estudos com HRV vêm apresentando significativos avanços, desde que a primeira sequência genômica completa de um sorotipo do HRV foi descrita (STANWAY, HUGHES *et al.*, 1984) até o sequenciamento completo de todos os sorotipos conhecidos até então (PALMENBERG, SPIRO *et al.*, 2009). Em

decorrência desses avanços, a concepção de que os HRV são primariamente agentes de resfriado comum tem sido extensamente revista, uma vez que esses vírus vêm sendo frequentemente associados com casos de bronquiolite (PAPADOPOULOS, MOUSTAKI *et al.*, 2002; MARGUET, LUBRANO *et al.*, 2009; CALVO, POZO *et al.*, 2010; BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011) e relacionados com exacerbações de asma, sendo inclusive considerados como uma das principais causas de desencadeamento de chiado em crianças que apresentam atopia (GERN e BUSSE, 1999; KOTANIEMI-SYRJANEN, VAINIONPAA *et al.*, 2003; MANOHA, ESPINOSA *et al.*, 2007; JACKSON, GANGNON *et al.*, 2008; KELLY e BUSSE, 2008; MACKAY, 2008; GERNA, PIRALLA *et al.*, 2009; JARTTI, PAUL-ANTTILA *et al.*, 2009; MILLER, EDWARDS *et al.*, 2009).

1.1. Características dos rinovírus

De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTVdB - *The Universal Virus Database*. www.ictvonline.org) os HRV pertencem à Família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*. Cerca de 100 sorotipos já foram identificados através de estudos com anticorpos neutralizantes (HAMPARIAN, COLONNO *et al.*, 1987) e atualmente são divididos em três espécies: A, B e C. O HRV-A possui 74 sorotipos conhecidos, enquanto que o HRV-B, 25 sorotipos, e o HRV-C, 10 sorotipos (ARDEN e MACKAY, 2010). Adicionalmente à utilização de anticorpos neutralizantes, análises de suscetibilidade a drogas e identificação de dois receptores celulares (molécula de adesão intercelular 1 – ICAM-1, *major receptor*, e receptor de lipoproteína de baixa densidade – LDLR, *minor receptor*) reforçaram a caracterização taxonômica e de sorotipagem dos HRV. Atualmente, a caracterização molecular do HRV constitui importante ferramenta para identificação das espécies e sorotipos desses agentes e vem confirmando a identificação sorotípica realizada anteriormente (LEWIS-ROGERS, BENDALL *et al.*, 2009).

Dentro deste contexto, tamanha diversidade pode ser evidenciada e melhor compreendida por estudos de sequenciamento parcial ou total do RNA viral,

sendo que a divergência inter e intraespecífica pode variar consideravelmente de acordo com o segmento genômico avaliado (SAVOLAINEN, BLOMQVIST *et al.*, 2002; SAVOLAINEN, MULDER *et al.*, 2002).

1.2. Estrutura viral e genômica, replicação e caracterização molecular dos HRV

Estruturalmente, os HRV são vírus não-envelopados, com capsídeo de simetria icosaédrica e a partícula viral medindo de 20 a 30 nm de diâmetro (figura 1).

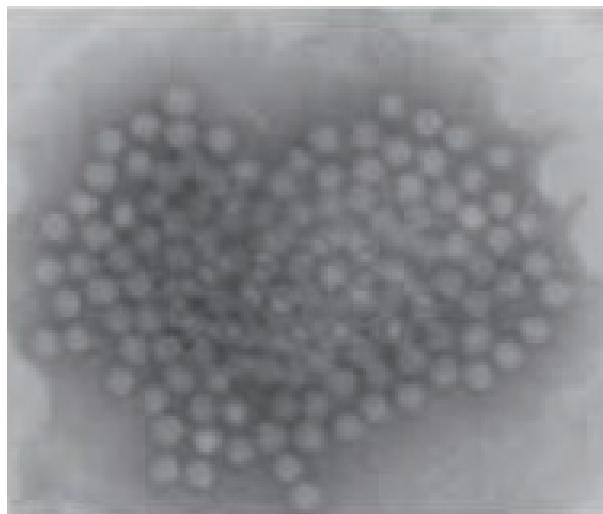


Figura 1. Eletromicrografia do HRV. Fonte: Dreschers *et al.*, 2007

A estrutura icosaédrica revela que cada capsômero é formado pela disposição das proteínas estruturais (*viral proteins*) VP1, VP2 e VP3, localizadas na superfície do vírus e sendo responsáveis pela diversidade antigênica viral. Dentre as proteínas localizadas no nucleocapsídeo, a VP1 contém o maior número de epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes, enquanto que a proteína VP4 localiza-se no interior do vírus, apresentando a função de ancorar o ácido nucléico ao capsídeo (KELLY e BUSSE, 2008; LEWIS-ROGERS, BENDALL *et al.*, 2009). Apesar da variedade de sorotipos, as espécies dos HRV apresentam significativas similaridades em determinados segmentos das proteínas que formam o nucleocapsídeo (KISTLER, WEBSTER *et al.*, 2007; LEWIS-ROGERS, BENDALL *et al.*, 2009).

O genoma é do tipo RNA de fita simples, não segmentado de polaridade positiva, com aproximadamente 7.200 nucleotídeos, composto por 11 genes (figura 2) traduzidos inicialmente em uma única poliproteína subdivididas em três regiões (P1, P2 e P3).

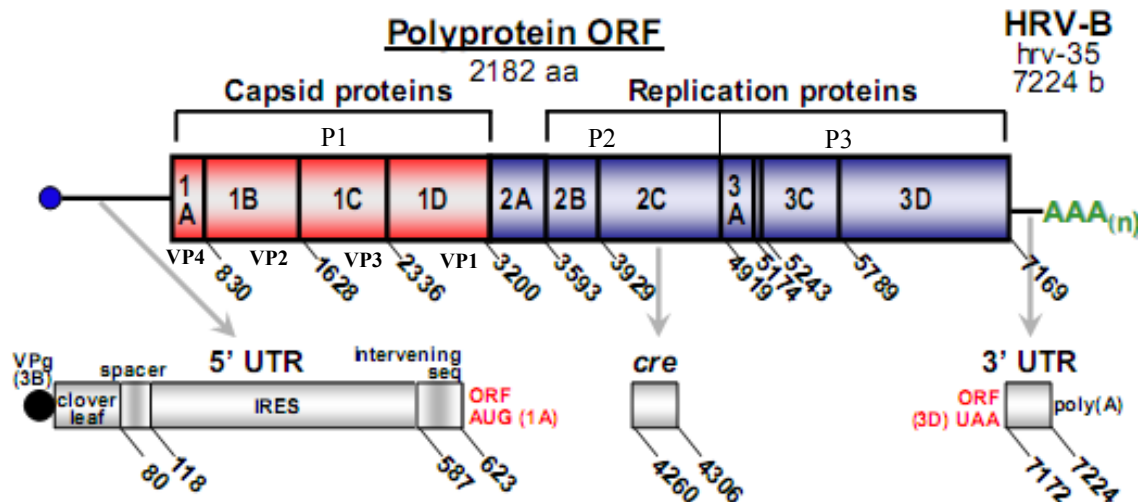


Figura 2. Organização genômica dos HRV. A sequência codificadora está indicada em vermelho e azul e é flanqueada pelas sequências não traduzidas 5'UTR e 3'UTR. Fonte: Palmenberg *et al.*, 2009

Subsequentemente, essas regiões são clivadas para formar as proteínas estruturais do capsídeo (VP1, VP2, VP3 e VP4) e as não-estruturais (2A^{PRO}, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C^{PRO} e 3D^{POL}) (KIRCHBERGER, MAJDIC *et al.*, 2007; KISTLER, WEBSTER *et al.*, 2007; MACKAY, 2008; LEWIS-ROGERS, BENDALL *et al.*, 2009). A sequência que codifica a poliproteína é flanqueada pelas regiões não traduzidas 5'UTR e 3'UTR, sendo a primeira responsável pelo auxílio no início da tradução do RNA viral e pelo direcionamento da maquinaria de multiplicação celular para a replicação do vírus.

Na primeira etapa do processo de replicação, os rinovírus utilizam apenas um receptor na adsorção à célula-alvo, sendo que a maior parte dos sorotipos conhecidos utiliza a ICAM-1 – *major* (GREVE, DAVIS *et al.*, 1989), que é expressa em diversos tecidos, incluindo o epitélio nasal. Após a adsorção, a partícula viral passa por uma mudança conformacional de tal modo que o

genoma e as proteínas virais são liberados no citossol da célula hospedeira. A liberação do genoma viral pode ocorrer pela expansão da estrutura do capsídeo, engatilhada tanto pela interação do ICAM-1 quanto pela acidificação endossomal. Em seguida, ocorre a tradução do RNA em uma poliproteína, com o auxílio da maquinaria de multiplicação celular. A proteína 3D^{Pol} é uma RNA polimerase dependente de RNA e é responsável pela replicação do RNA genômico viral. Com isso, a poliproteína formada é clivada originando dois tipos de proteínas virais. Por fim, o vírion é montado e liberado da célula hospedeira.

Antes do advento de metodologias baseadas em RT-PCR para detecção dos HRV, o isolamento viral em linhagens celulares era a principal ferramenta laboratorial aplicada a esses agentes. Entretanto, algumas cepas não podem ser cultivadas, sendo que ainda não há um sistema de cultivo celular que permita o isolamento dos HRV-C (MACKAY, 2008; ARDEN e MACKAY, 2010). Em adição, devido à grande diversidade de sorotipos conhecidos do vírus, o diagnóstico sorológico é impraticável (JARTTI, PAUL-ANTTILA *et al.*, 2009; ARDEN e MACKAY, 2010).

Considerando isso, com a aplicação da RT-PCR, muitos alvos para amplificação de parte do genoma do vírus, bem como seu aprimoramento vêm sendo desenvolvidos (BRIESE, RENWICK *et al.*, 2008; FAUX, ARDEN *et al.*, 2011). Com isso, a participação dos HRV em doenças respiratórias tem sido mais frequentemente demonstrada (MILLER, LU *et al.*, 2007; GERNA, PIRALLA *et al.*, 2009).

Com a recente caracterização dos HRV-C, diversos segmentos genômicos dos HRV, ou mesmo seu genoma completo, vem sendo utilizados com o propósito de se identificar e caracterizar este novo grupo. Apesar de ser uma espécie que possivelmente vêm circulando na população humana há muitos anos, sua caracterização foi descrita somente em 2006, a partir do sequenciamento do gene dos capsídeos VP4/VP2 (ARDEN, MCERLEAN *et al.*, 2006; BRIESE, RENWICK *et al.*, 2008). A partir daí, outros relatos confirmaram a identificação deste grupo taxonômico, demonstrando uma nítida divergência em termos filogenéticos, tanto com relação à sequência nucleotídica quanto a de identidade

de aminoácidos em comparação com as espécies A e B (KISTLER, WEBSTER *et al.*, 2007; LAU, YIP *et al.*, 2007; LEE, KIESNER *et al.*, 2007; TAPPAREL, JUNIER *et al.*, 2007).

Anteriormente, a caracterização do HRV-C não estava evidenciada devido, em parte, ao fato de ter sido realizada com a sequência da 5'UTR (SAVOLAINEN-KOPRA, BLOMQVIST *et al.*, 2009). Esta região parece estar sujeita a constantes eventos recombinatórios, o que poderia promover mudanças nas relações filogenéticas entre os HRV, em comparação às regiões genômicas das proteínas VP4/VP2, VP1 e 3D^{pol}, principalmente no que se refere às espécies A e C (MCINTYRE, MCWILLIAM LEITCH *et al.*, 2010; SIMMONDS, MCINTYRE *et al.*, 2010). Por isso, parte das novas cepas identificadas era considerada como novos membros pertencentes aos HRV-A (LEE, KIESNER *et al.*, 2007). Dentro deste contexto, tanto a avaliação do genoma completo quanto a região genômica que codifica para as proteínas do capsídeo VP4/VP2 permitem a devida caracterização dos HRV (SAVOLAINEN, BLOMQVIST *et al.*, 2002; SAVOLAINEN, MULDER *et al.*, 2002; PALMENBERG, SPIRO *et al.*, 2009). Apesar disso, em decorrência da elevada diversidade dos HRV, a RT-PCR não garante a detecção de todas as cepas conhecidas, principalmente se for levada em consideração apenas um alvo genômico (FAUX, ARDEN *et al.*, 2011).

1.3. Epidemiologia

Os rinovírus são amplamente distribuídos, afetando tanto crianças quanto adultos, estando o indivíduo imunocomprometido ou não. Muitos estudos vêm apontando os HRV como agentes tão frequentemente detectados em crianças quanto o vírus respiratório sincicial (VRS), envolvendo inclusive o TRI e sua circulação ocorre durante todos os meses do ano, porém é detectado predominantemente nos meses mais frios, tanto em países temperados quanto em tropicais (PAPADOPOULOS, MOUSTAKI *et al.*, 2002; VAN BENTEN, KOOPMAN *et al.*, 2003; ARDEN, MCERLEAN *et al.*, 2006; COSTA, YOKOSAWA *et al.*, 2006; LAU, YIP *et al.*, 2007; LEE, KIESNER *et al.*, 2007;

BELLEI, CARRARO *et al.*, 2008; BRIESE, RENWICK *et al.*, 2008; MARGUET, LUBRANO *et al.*, 2009; BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011).

A detecção do RNA viral em indivíduos assintomáticos, apesar de levantar dúvidas quanto ao seu papel no desencadeamento da doença respiratória, pode levar a crer que esses indivíduos possam representar um importante papel epidemiológico quanto à transmissão desses agentes para crianças mais suscetíveis (VAN BENTEN, KOOPMAN *et al.*, 2003; PELTOLA, WARIS *et al.*, 2008; VAN DER ZALM, VAN EWIJK *et al.*, 2009).

Considerando isso, um estudo avaliou 107 crianças (de 1 a 17 anos de idade) que aparentemente não apresentavam sintomas do trato respiratório e o RNA dos HRV foi detectado em 18% das amostras (NOKSO-KOIVISTO, PITKARANTA *et al.*, 2002). Porém, foi constatado que 81% dessas crianças apresentaram sintomas respiratórios em período recente que antecedeu a coleta, ou estavam em contato com indivíduos da mesma moradia que apresentaram sintomas respiratórios, ou ainda apresentaram sintomas clínicos após a coleta da amostra.

A frequência de detecção das três espécies dos HRV pode variar de acordo com aspectos sazonais e características dos grupos de indivíduos avaliados, tais como hospitalização, idade, tipos de sintomas clínicos e presença de doenças de base. Apesar de diferentes estudos aplicarem diferentes critérios epidemiológicos e metodológicos, geralmente HRV da espécie A são os mais frequentes, seguidos pelos HRV-C (PIRALLA, ROVIDA *et al.*, 2009; WATANABE, CARRARO *et al.*, 2010). Entretanto, o HRV-C também podem ser apontado como a espécie predominante (MILLER, EDWARDS *et al.*, 2009), porém, em nenhum dos estudos citados acima constatou-se a predominância dos HRV-B.

1.4. Patogênese e sintomas clínicos

Grande parte das informações sobre a dinâmica de transmissão e infecção dos HRV advém de estudos realizados com voluntários (CATE, COUCH *et al.*, 1964; WINTHER, GWALTNEY *et al.*, 1986; BARDIN, SANDERSON *et al.*, 1996). A partir da utilização da RT-PCR, somado às análises de

imunohistoquímica, hibridização *in situ* e a RT-PCR *in situ*, diversos aspectos da infecção dos HRV puderam ser mais amplamente abordados e confirmados (MOSSER, VRTIS *et al.*, 2005; WOS, SANAK *et al.*, 2008; BRABEC-ZARUBA, PFANZAGL *et al.*, 2009).

Aparentemente, os HRV não causam significativas alterações histopatológicas em termos de destruição epitelial (WINTHER, GWALTNEY *et al.*, 1986). Em adição, a infecção por HRV no trato respiratório inferior parece ocorrer de modo focalizado, ou seja, não se estendendo para tecidos adjacentes (HAYDEN, 2004; MOSSER, VRTIS *et al.*, 2005). Considerando isso, a resposta imunológica do hospedeiro parece desempenhar um importante papel no processo de patogenicidade do resfriado comum ou mesmo de doenças envolvendo o TRI. Ainda, infecções por HRV costumam se desenvolver em um curto espaço de tempo, com período de incubação de 10-12 horas, pico de infecção de 2-3 dias e eliminação viral antes mesmo que uma resposta imunológica adaptativa por anticorpos possa ser elaborada.

Os HRV replicam-se melhor em temperaturas de 33-35°C, por isso as vias aéreas superiores representam um ambiente mais propício à replicação viral. Condizente com este aspecto, os HRV são considerados as causas mais frequentes de resfriados comuns, sendo responsáveis por até 50% de todos os casos de infecções envolvendo o trato respiratório superior em indivíduos de todas as idades (HEIKKINEN E JARVINEN, 2003).

Em contrapartida, o papel dos HRV em infecções respiratórias envolvendo o TRI vem sendo extensivamente avaliado, principalmente após a caracterização dos HRV-C, referidos como importantes causas de doença respiratória grave em crianças, podendo levar até a hospitalizações (PAPADOPOULOS, MOUSTAKI *et al.*, 2002; HAYDEN, 2004; MOSSER, VRTIS *et al.*, 2005; LAU, YIP *et al.*, 2007; LINSUWANON, PAYUNGORN *et al.*, 2009; MILLER, EDWARDS *et al.*, 2009; ARDEN, FAUX *et al.*, 2010). Neste contexto, os HRV têm sido comumente detectados em crianças com diagnóstico clínico de pneumonia e bronquiolite, sendo inclusive referidos como a segunda maior causa de bronquiolite em crianças, depois do vírus respiratório sincicial, como

mentionado anteriormente (PAPADOPOULOS, MOUSTAKI *et al.*, 2002; MARGUET, LUBRANO *et al.*, 2009; BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011).

Algumas evidências têm demonstrado a relação efetiva dos HRV com doença respiratória grave do TRI, por intermédio da avaliação de escarro, lavado broncoalveolar e em biópsia brônquica ou através de estudos em crianças traqueostomizadas, detectando os HRV mais frequentemente em indivíduos com resfriado do que em sadios (MOSSER, VRTIS *et al.*, 2005; SIMONS, SCHROTH *et al.*, 2005; WOS, SANAK *et al.*, 2008). Em adição, foi constatado que a multiplicação dos HRV *in vitro* ocorre de modo mais eficiente em linhagens de cultura primária de células epiteliais das vias respiratórias inferiores, em relação às superiores (LOPEZ-SOUZA, FAVORETO *et al.*, 2009).

Alguns estudos também evidenciaram os HRV como a principal causa de chiado na infância e, neste caso, com uma possível evolução para asma em crianças em uma relação causal de infecções virais e asma (GERN e BUSSE, 1999; MILLER, EDWARDS *et al.*, 2009; GERN, 2010). Neste sentido, as infecções por esses vírus podem estar envolvidas no aumento da expressão de genes relacionados a respostas inflamatórias que desencadeariam quadros de asma (BOCHKOV, HANSON *et al.*, 2010).

Diversos outros quadros clínicos são comumente relacionados aos HRV, com diferentes predominâncias entre as espécies e de gravidade de infecção. Doença semelhante à influenza (*influenza-like illness*) foi relatada principalmente associada a infecções pelos HRV-A e HRV-B (BELLEI, CARRARO *et al.*, 2008; WATANABE, CARRARO *et al.*, 2010). Os HRV-C foram relatados em quadros clínicos mais graves envolvendo o TRI, tais como casos de febre com chiado e subsequente exacerbação de asma, hospitalizações por asma e de bronquiolite (LAU, YIP *et al.*, 2007; MCERLEAN, SHACKELTON *et al.*, 2007; LINSUWANON, PAYUNGORN *et al.*, 2009; MILLER, EDWARDS *et al.*, 2009; PIRALLA, ROVIDA *et al.*, 2009; ARDEN e MACKAY, 2010; BROBERG, NIEMELA *et al.*, 2011). Por outro lado, outros estudos relataram uma equivalência de gravidade entre os HRV-A e HRV-C (HAN, CHUNG *et al.*, 2009; XIANG, GONZALEZ *et al.*, 2010).

Entretanto, além da espécie viral, determinados fatores de risco do hospedeiro também são importantes no agravamento da doença. Neste aspecto, os HRV podem desempenhar um importante papel em pacientes que apresentam doenças crônicas de base, em crianças com histórico familiar de atopia, de tenra idade e imunocomprometidos (DRESCHERS, DUMITRU *et al.*, 2007; MANOHA, ESPINOSA *et al.*, 2007; MILLER, LU *et al.*, 2007; WATANABE, CARRARO *et al.*, 2010; BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011; BROBERG, NIEMELA *et al.*, 2011; MILLER, WILLIAMS *et al.*, 2011). Neste último estudo citado, por exemplo, foi constatado que atopia materna, além de co-infecções, resultou em maior número de casos de bronquiolite em relação a sintomas do TRS, enquanto que MARGUET, LUBRANO *et al.* (2009) relacionaram maior gravidade da doença com fator etário, tendo sido avaliados 207 crianças menores de um ano de idade. Em adição, doenças congênitas cardíacas e prematuridade também vêm sendo relacionadas com gravidade das infecções pelos HRV (MCGRATH-MORROW, LEE *et al.*, 2010; WATANABE, CARRARO *et al.*, 2010). Dentro deste contexto, fatores de risco para o agravamento das IRAs foram relatadas como mais importantes do que co-infecção (BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011). Porém, o papel das co-infecções no agravamento da doença ainda é contraditório, considerando o estudo de MILLER, WILLIAMS *et al.* (2011), que constataram que a maioria das co-infecções resultou em bronquiolite, em comparação com infecções do TRS.

1.5. Co-infecções

Os HRV têm sido frequentemente detectados com outros vírus respiratórios, tais como: VRS, vírus influenza, vírus parainfluenza (PIV), adenovírus (AdV), metapneumovírus humano (hMPV), bocavírus humano (hBoV) e enterovírus (PAPADOPOULOS, MOUSTAKI *et al.*, 2002; JACQUES, BOUSCAMBERT-DUCHAMP *et al.*, 2006; MANOHA, ESPINOSA *et al.*, 2007; MILLER, LU *et al.*, 2007; MARGUET, LUBRANO *et al.*, 2009; CALVO, POZO *et al.*, 2010).

Apesar de alguns relatos demonstrarem que infecções por HRV estarem comumente associadas a infecções com outros vírus respiratórios, particularmente com o VRS, outro estudo demonstrou uma relação oposta: infecções por HRV estão associadas a uma reduzida probabilidade em se adquirir infecções por outros vírus respiratórios (GREER, MCERLEAN *et al.*, 2009). Entretanto, tal relação pode ser específica entre uma determinada espécie do HRV e um outro vírus, como relatado na interação negativa entre o HRV-C e o VRS ou o hMPV, mas não o AdV (WISDOM, KUTKOWSKA *et al.*, 2009).

Quanto à gravidade, alguns estudos relatam que infecções duplas parecem decorrer em um agravamento de doenças respiratórias do trato respiratório inferior (LINSUWANON, PAYUNGORN *et al.*, 2009; FRANZ, ADAMS *et al.*, 2010). Em contrapartida, outros relatos não inferem um significativo agravamento da doença respiratória em co-infecções, com apresentação de índices comparáveis às infecções simples causadas pelos HRV (LAU, YIP *et al.*, 2007; GERNA, PIRALLA *et al.*, 2009).

Em decorrência dessa discrepância de resultados, muitas questões acerca das co-infecções permanecem obscuras. A principal delas é se essa condição pode de fato resultar em sintomas clínicos mais graves; ou ainda se esta gravidade dos sintomas está associada com a interação específica de uma espécie do HRV (ou mesmo em nível de sorotipos) com um (ou mais) vírus respiratório(s) e se determinada espécie do HRV estaria relacionada a tipo(s) específico(s) de sintoma(s). Em adição, a avaliação da gravidade clínica associada às infecções com os HRV, sozinhos ou em co-infecções, é pouco explorada em relação às co-morbidades.

Dentro deste contexto, considerando os poucos estudos sobre os fatores que levam ao aumento da gravidade das doenças respiratórias provocada pelos HRV em crianças jovens, abordando tanto aspectos virológicos quanto dos pacientes, faz-se fundamental a investigação desses casos com o objetivo de elucidar os dados conflitantes.

2. OBJETIVOS

Objetivo principal

Identificar fatores virológicos e do hospedeiro que podem estar envolvidos com o aumento da gravidade de infecções respiratórias causadas pelos rinovírus humano em crianças de até cinco anos de idade

Objetivos específicos

- 1) Determinar a frequência dos rinovírus humano, tanto em termos de infecções simples quanto de co-infecções, utilizando a RT-PCR em aspirados de nasofaringe, coletados entre janeiro de 2001 e junho de 2011, de crianças de até cinco anos de idade com sintomas de infecção respiratória aguda;
- 2) Investigar a presença dos vírus respiratório sincicial (VRS), vírus influenza A e B, vírus parainfluenza 1, 2, 3 (PIV 1-3), adenovírus (AdV) e metapneumovírus humano (hMPV) por (RT-)PCR e/ou imunofluorescência indireta (IFI), nos aspirados de nasofaringe nos quais os HRV tenham sido detectados;
- 3) Avaliar se há associação entre co-infecções dos HRV com os vírus respiratórios mencionados acima e com doença respiratória grave;
- 4) Caracterizar molecularmente os HRV detectados através da identificação das espécies;
- 5) Avaliar se há associação entre determinada espécie dos HRV e gravidade da doença;
- 6) Avaliar fatores de risco do hospedeiro para o agravamento de doenças respiratórias agudas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes e locais de atendimento

De janeiro de 2001 a junho de 2011, 434 amostras de secreção de nasofaringe de crianças de até cinco anos de idade com infecção respiratória aguda, colhidas até o quinto dia do início dos sintomas, foram selecionadas para este estudo. Essas amostras foram sendo processadas e estocadas à medida que a coleta foi sendo realizada, sendo que para este estudo as mesmas foram avaliadas a partir dos estoques congelados.

Os pacientes foram contatados ao serem atendidos em algumas unidades de atendimento à saúde do município de Uberlândia e nos seguintes locais do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU): i) pronto-socorro de pediatria (PS-Ped), ii) pronto atendimento pediátrico (PAP), iii) enfermaria pediátrica (ENF-Ped), iv) unidade de terapia intensiva pediátrica (UTI-Ped), v) unidade de terapia intensiva neonatal (UTI-Neo) e vi) berçário. Amostras também foram coletadas na Clínica Infantil do Hospital Dom Bosco de Uberlândia.

As amostras advindas do Hospital Dom Bosco, além daquelas das unidades de saúde e o PAP (HC/UFU), constaram de casos que requereram intervenção de baixa complexidade clínica. Em casos de doenças moderadas a graves, os pacientes foram encaminhados aos seguintes setores do HC/UFU: PS-Ped, ENF-Ped, UTI-Ped, UTI-Neo e berçário, sendo que este último foi responsável pelo atendimento de crianças menores de um mês de idade, geralmente prematuros.

Dados dos pacientes, tais como idade e gênero, local e data do atendimento, sintomas clínicos, progressão para internação ou não e apresentação ou não de co-morbidades, também foram obtidos no momento da coleta dos espécimes clínicos, por preenchimento de ficha clínica pelo médico responsável (ANEXO I), ou de consulta dos prontuários nos arquivos médicos do hospital. Após a coleta, as amostras foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Virologia da UFU, e processadas para investigação viral e estocagem.

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFU aprovou o projeto desta pesquisa e a coleta das amostras sob protocolos de registros números: 018/2000, 151/04, 144/05, 145/05, 166/05, 261/07, 365/07, 326/08, 384/08, 387/08, 390/08, 025/09, 135/09, 024/09, 218/09 e 877/11. O termo de consentimento para realização deste procedimento foi obtido dos pais ou responsáveis de cada paciente (ANEXO II).

3.2. Critérios clínicos e gravidade dos sintomas

Foram considerados como apresentando infecção do TRS aqueles com descrição de: coriza, gripe, resfriado comum, laringite, faringite, traqueíte, laringotraqueobronquite (CROUP) e bronquite sem sibilos, com ou sem febre. Os sintomas envolvendo o TRI foram: bronquite sibilante, broncoespasmo, bronquiolite e pneumonia. Para os pacientes que apresentaram sintomas mistos, envolvendo o TRS e o TRI, foi considerado o último. Os diagnósticos clínicos foram realizados de acordo com “10th Review on International Classification of Diseases” (ICD-10 – *World Health Organization*, 1994), pelos médicos responsáveis pelos atendimentos aos pacientes.

Neste estudo, os sintomas considerados brandos constituíram a maioria daqueles envolvendo o TRS e/ou considerados pelo médico como tal, também levando-se em consideração a não necessidade de internação relacionada exclusivamente à condição respiratória e o atendimento em locais que não requereram elevada complexidade de intervenção clínica.

Os sintomas considerados moderados a graves incluíram todos os casos informados pelo médico como tal, somado às seguintes informações: necessidade de internação especificamente relacionada à condição respiratória, incluindo os casos encaminhamento à UTI (pediátrica ou neonatal), necessidade de ventilação mecânica e suplementação de oxigênio. Todos os pacientes com pneumonia também foram considerados nesta categoria, sendo este sintoma classificado como pneumonia, pneumonia severa ou pneumonia muito severa de acordo com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005).

Bronquiolite foi caracterizada como branda, moderada ou grave seguindo parâmetros previamente definidos (DE BOECK, VAN DER AA *et al.*, 1997). Escores clínicos definidos por TAUSSIG, CASTRO *et al.*, (1975) foram utilizados para classificar outras doenças envolvendo o TRI

3.3. Fatores de risco para o agravamento das IRAs

Para avaliação dos fatores do hospedeiro associados à doença grave, foram obtidos informações sobre os fatores de risco do paciente, levantadas de acordo com as informações disponíveis nas fichas clínicas e em consultas dos prontuários médicos. Foram considerados como fatores de risco aqueles descritos na literatura e constaram de prematuridade (idade gestacional inferior a 35 semanas), tenra idade (crianças menores de seis meses de idade), doenças congênitas cardíacas, doenças respiratórias não infecciosas (displasia broncopulmonar, hipertensão pulmonar e fibrose cística), tabagismo gestacional, doenças atópicas, doenças do sistema nervoso, síndrome de Down, síndrome de West, entre outros.

3.4. Coleta, processamento e estocagem das amostras

A coleta foi realizada como previamente descrita (OLIVEIRA, FREITAS *et al.*, 2008), instilando-se 0,5 mL de soro fisiológico (0,9% NaCl) em cada uma das narinas de cada paciente, seguida de aspiração da secreção de nasofaringe por um sistema a vácuo utilizando um catéter. Posteriormente, a secreção foi alocada em um recipiente estéril e encaminhada, em gelo, ao Laboratório de Virologia, sendo imediatamente processadas.

As amostras clínicas, contendo as células da mucosa dos pacientes, foram processadas como previamente descrito (QUEIROZ, DURIGON *et al.*, 2002). Resumidamente, foi adicionado ao aspirado de nasofaringe um volume de *phosphate-buffered saline* (PBS) para dissociar o muco. Em seguida, três alíquotas da amostra foram preparadas: uma foi armazenada em nitrogênio líquido para inoculação em cultura de células, adicionando-se à alíquota um volume de meio de congelamento (dimetil sulfoxido 10% em soro fetal bovino);

outras duas foram armazenadas a -70°C constando de amostras clínicas *in natura*. O restante foi centrifugado (350xg/10min/4°C) e o sobrenadante foi armazenado a -70°C. Em seguida, o sedimento contendo as células da mucosa foi lavado duas vezes com PBS, e as células imediatamente utilizadas para o teste de imunofluorescência indireta.

3.5. Imunofluorescência indireta

As reações de imunofluorescência indireta (IFI) foram conduzidas em todas as amostras de NF coletadas neste estudo, através da utilização de anticorpos monoclonais contra vírus respiratório sincicial, vírus influenza A e B, vírus parainfluenza 1, 2 e 3 e adenovírus do “Respiratory Panel I Viral Screening and Identification Kit” (Merck Millipore - Concord Road, Billerica, MA, EUA), de acordo com instruções do fabricante. O resultado do teste seguiu os critérios estipulados por QUEIRÓZ, DURIGON *et al.*, (2002): positivo quando mais de três células apresentaram fluorescência; negativo se nenhuma fluorescência foi observada e mais de 20 células foram visualizadas; e suspeito se menos três células mostraram fluorescência. Neste último caso, a reação foi repetida e, no caso do resultado ainda ter sido considerado suspeito, o teste foi tido como inconclusivo.

3.6. Extração de RNA

O RNA viral foi extraído de todas as amostras testadas pela IFI, a partir de aspirado de nasofaringe utilizando-se Trizol® (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com instruções do fabricante, porém ajustado para metade do volume recomendado. Resumidamente, 125 µL da amostra foram misturados com 375 µL de Trizol® e, em seguida, foram adicionados 2,5 µL de glicogênio (20 mg/mL) e 200 µL de clorofórmio. A mistura foi novamente agitada e incubada por dois minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 12.000xg/15min/4°C. A fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para outro tubo ao qual foram adicionados 300 µL de isopropanol, sendo a mistura homogeneizada por inversão, incubada por 10

minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 12.000xg a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 500 µL de etanol 75% (preparado com água tratada com dietilpirocarbonato – DEPC). Em seguida, o RNA foi ressuspensão com 20 µL de água tratada com DEPC, sendo imediatamente utilizado para síntese do DNA complementar (cDNA) ou armazenado à -70°C.

3.7. Oligonucleotídeos utilizados para síntese do DNA complementar (cDNA), PCR e sequenciamento

Para as reações de amplificação por RT-PCR foram utilizados oligonucleotídeos descritos anteriormente (ARRUDA e HAYDEN, 1993; SAVOLAINEN, BLOMQVIST *et al.*, 2002) (tabela 1 e figura 3). O oligonucleotídeo HRVSAV(-) foi modificado adicionando-se uma sequência (sublinhada) não relacionada ao genoma do HRV.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para as reações de amplificação dos HRV por RT-PCR e de sequenciamento

<i>Primer</i>	<i>Posição</i>	<i>Orientação</i>	<i>Gene</i>	<i>Descrição (5' - 3')</i>	<i>Referência</i>
110822	168-183	<i>sense</i>	5'UTR	GCA CTT CTG TTT CC CC	ARRUDA e HAYDEN (1993)
HRVSAV(+)	534-560	<i>sense</i>	5'UTR	GGG ACC AAC TAC TTT GGG TGT CCG TGT	SAVOLAINEN, BLOMQVIST <i>et al.</i> (2002)
HRVSAV(-)	1.083- 1.058	<i>anti-sense</i>	VP2	<u>TGC AGG GCT GGC</u> <u>AAG CCA CG</u> GCA TCI GGY ARY TTC CAC CAC CAN CC	SAVOLAINEN, BLOMQVIST <i>et al.</i> (2002) modificado (este estudo)
PGEXFR		<i>anti-sense</i>	VP2	<u>TGC AGG GCT GGC</u> <u>AAG CCA CG</u>	

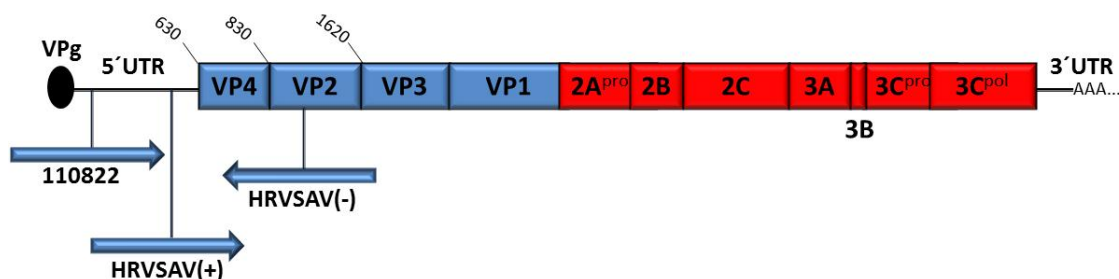


Figura 3. Mapa da localização aproximada dos *primers*, indicados por setas largas. A direção das setas indica a orientação 5' a 3' dos oligonucleotídeos *sense* e *anti-sense*.

3.7.1. Síntese do cDNA – Todas as amostras positivas para o HRV foram submetidas à síntese do cDNA, seguindo parâmetros previamente descritos (ARRUDA e HAYDEN, 1993), com modificação descrita por COSTA, YOKOSAWA *et al.* (2006). Inicialmente, 5,0 µL do RNA extraído foram adicionados a uma mistura contendo 4 nmol de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato (Roche, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça), 20,0 pmol do iniciador 110822 (tabela 1), e água tratada com DEPC até completar um volume de 8,4 µL por amostra. A mistura foi incubada por cinco minutos à 95°C e transferida imediatamente a um banho de gelo. Dois minutos depois, foi adicionada uma segunda mistura, contendo 4,0 µL de 5X *First-strand buffer* (Life Technologies), 2,0 µL de 0,1M DTT, 60 unidades da enzima transcriptase reversa de M-MuLV (Fermentas International Inc., Burlington, Canadá ou New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA) e 6 unidades de inibidor de RNase (Fermentas), totalizando um volume final de 20,0 µL. Posteriormente, a mistura foi submetida a 48°C por 60 minutos, sendo a enzima inativada por incubação a 95°C por 10 minutos. O cDNA foi imediatamente submetido à PCR ou estocado a -20°C.

3.7.2. Reação em cadeia da polimerase – Para a primeira amplificação, 2,5 µL do cDNA foram transferidos para um tubo de PCR contendo: 0,8 µM dos *primers* 110822 e HRVSAV(-), 1,25 unidades de *Taq* DNA polimerase (Roche, Life Technologies), 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato, 10 mM

Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8,3 e H₂O Milli-Q em volume de reação de 25,0 µL. Para a reação, foi utilizado *Touchdown* PCR nas seguintes condições: 10 minutos a 94°C, 17 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C (com decréscimo de 1°C por ciclo) e 90 segundos a 72°C. Após a temperatura de hibridização dos oligonucleotídeos ter alcançado 48°C, seguiram-se mais 18 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C e 90 segundos a 72°C, seguidos por 5 minutos adicionais a 72°C.

Dois microlitros da primeira amplificação foram diluídos 1:100 em água Milli-Q e, subsequentemente, 2,0 µL da diluição foram pipetados para o tubo da segunda amplificação, contendo: 0,3 µM dos *primers* HRVSAV(+) e HRVSAV(-), 1,5 unidades de *Taq* DNA polimerase, 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8,3 e H₂O Milli-Q em um volume final de 30 µL. As condições da reação foram: 10 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C e 90 segundos a 72°C, seguidos por 5 minutos adicionais a 72°C. Ao final, a amplificação da segunda PCR produziu um fragmento de 570 nucleotídeos.

3.7.3. Visualização dos produtos amplificados em gel de agarose –

Cinco µL dos produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X contendo brometo de etídeo 0,3 µg/mL. Alternativamente, as amostras foram coradas com 1 µL de GelRedTM *Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA), diluído 1:1000. O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado por um sistema digital com câmera convencional.

3.7.4 Sequenciamento

– Foi possível realizar o sequenciamento de 75 amostras, sendo que a purificação dos produtos amplificados da segunda PCR foi realizada com “Invisorb Spin DNA Extraction Kit” (Invitek Inc., Hayward, CA, EUA) ou “GeneJET PCR Purification Kit” (Fermentas®), de acordo com as instruções do fabricante. No caso da amplificação contendo bandas inespecíficas, a purificação foi realizada a partir da banda formada pela sequência de DNA de

tamanho esperado e cortada do gel de agarose. Os *amplicons* foram sequenciados em ambas as fitas, utilizando-se “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing KitTM” (GE Healthcare UK Limited, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), com os oligonucleotídeos HRVSAV(+) e PGEXFR, seguindo as instruções do fabricante. As condições do termociclador foram: 95°C por 20 segundos, 60°C por 15 segundos e 50°C por um minuto, repetidos em 35 ciclos.

3.7.5. Edição, alinhamento das sequências e análise filogenética – De todas as amostras submetidas ao sequenciamento, foi possível obter o produto adequadamente sequenciado de 42 amostras. A edição foi realizada utilizando-se o programa SeqMan do pacote Lasergene versão 9,1 (DNASTAR, Inc. Madison, WI, EUA), analisando-se os eletroferogramas obtidos do sequenciamento com cada oligonucleotídeo. O alinhamento e análise filogenética foram realizados com o programa MegaAlign do pacote Lasergene. As sequências utilizadas como referências foram obtidas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e escolhidas aleatoriamente: HRV da espécie A, números de acesso: FJ445111; FJ445113, FJ445117, FJ445190, FJ445125, FJ445126 e FJ445127; HRV de espécie B: FJ445187, FJ445188, FJ445153 e FJ445155; HRV-C: DQ875932, GQ223227, EF077280, EF186077 e EF582387. As sequências de echovírus (X80059) e de poliovírus (V01149) foram obtidas após busca por BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov).

As sequências obtidas e as de referências citadas acima, foram alinhadas pelo método ClustalW a partir da sequência de aminoácidos. A árvore filogenética foi gerada pelo método de *neighbor-joining* utilizando análise de *Bootstrap* (1000 réplicas), do programa MegaAlign (DNASTAR).

3.8. RT-PCR para detecção de outros vírus respiratórios

As amostras submetidas à IFI também foram testadas por RT-PCR para detecção de VRS, vírus influenza, PIV e AdV, uma vez que esse método é potencialmente mais sensível que a IFI. Em adição, o hMPV foi avaliado apenas

por RT-PCR. No caso da PCR para adenovírus, o DNA foi obtido da fase orgânica da extração do ácido nucléico por Trizol®, conforme instruções do fabricante.

Dessa forma, as reações foram conduzidas de acordo com protocolos já descritos: VRS e vírus influenza (STOCKTON, ELLIS *et al.*, 1998), PIV 1, 2 e 3 (ECHEVARRIA, ERDMAN *et al.*, 1998), hMPV (MIRAZO, RUCHANSKY *et al.*, 2005) e AdV (ARAÚJO, YOKOSAWA *et al.*, 2001).

3.9. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES, AYRES *et al.*, 2007). O teste de Qui-Quadrado e o teste G foram utilizados para avaliar as diferenças de proporção dos casos e resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os valores de média são apresentados com seus respectivos desvio padrão.

4. RESULTADOS

Para investigar os fatores que poderiam levar ao aumento da gravidade das infecções respiratórias causadas pelo rinovírus, foram coletadas amostras de secreção de nasofaringe de crianças de até cinco anos de idade com infecção respiratória aguda. Foram coletadas e testadas 434 amostras para detecção dos seguintes vírus respiratórios: HRV, VRS, vírus influenza, PIV, AdV e hMPV.

Pelo menos um desses vírus foi detectado em 88,2% (383/434) das amostras utilizando IFI e/ou RT-PCR (tabela 2). A média da idade das crianças infectadas foi de 12,3 meses, sem predominância dos casos de acordo com o gênero avaliando-se cada faixa etária isoladamente.

Quase metade das infecções ocorreu em crianças menores de seis meses de idade (45,7%). Este grupo de pacientes apresentou doença mais grave em relação a outras faixas etárias, com predominância dos casos de hospitalizações, sintomas envolvendo o TRI e atendimentos que requereram intervenção de moderada a elevada complexidade clínica na UTI, PS, enfermarias ou berçário do HC/UFU.

Tabela 2. Características das 383 crianças menores de cinco anos de idade com infecção respiratória aguda ocasionada por pelo menos um vírus respiratório.

Idade ^a	N (%)	Média da idade ^a	M/F	Hospitalização (%) [*]	ITRI (%) [*]	ITRS (%) [*]	Co-morbidade presente ^b (%) [*]	Atendimento de média a elevada complexidade clínica ^c (%) [*]
0–6	175 (45,7)	2,3 (±1,37)	99/76	129 (73,7)	119 (68,0)	56 (32,0)	89 (69,5)	140 (80,0)
6–12	61 (15,9)	8,6 (±1,46)	37/24	15 (24,6)	35 (57,4)	26 (42,6)	16 (26,2)	21 (34,4)
12–24	80 (20,9)	17,1 (±3,69)	45/35	15 (18,7)	22 (27,5)	58 (72,5)	27 (33,7)	15 (18,7)
≥24	67 (17,5)	39,6 (±11,61)	36/31	10 (14,9)	17 (25,4)	50 (74,6)	16 (23,9)	12 (17,9)
Total	383 (100,0)	12,3 (±15,20)	217/166	169 (44,1)	193 (50,4)	190 (49,6)	148 (44,1)	188 (49,1)

M – masculino; F – feminino; ITRI/IRTS – infecções do trato respiratório inferior e superior, respectivamente

^{*}Com relação ao número de casos de cada faixa etária

^aIdade em meses

^bPrematuridade, cardiopatias, doenças respiratórias não infecciosas ou outras menos frequentes

^cUTI, PS, enfermaria e berçário do HC-UFU

Das 434 amostras investigadas, os HRV e o VRS foram os vírus mais frequentemente detectados, sendo identificados em 41,7% e 36,4% das amostras, respectivamente (figura 4). Dentre as amostras positivas para os HRV, esses vírus foram identificados como o único agente em 59,1% (107/181) dos casos. Nas demais amostras (40,9%, 74/181), ocorreu co-infecção e o vírus mais frequentemente detectado com HRV foi o VRS.

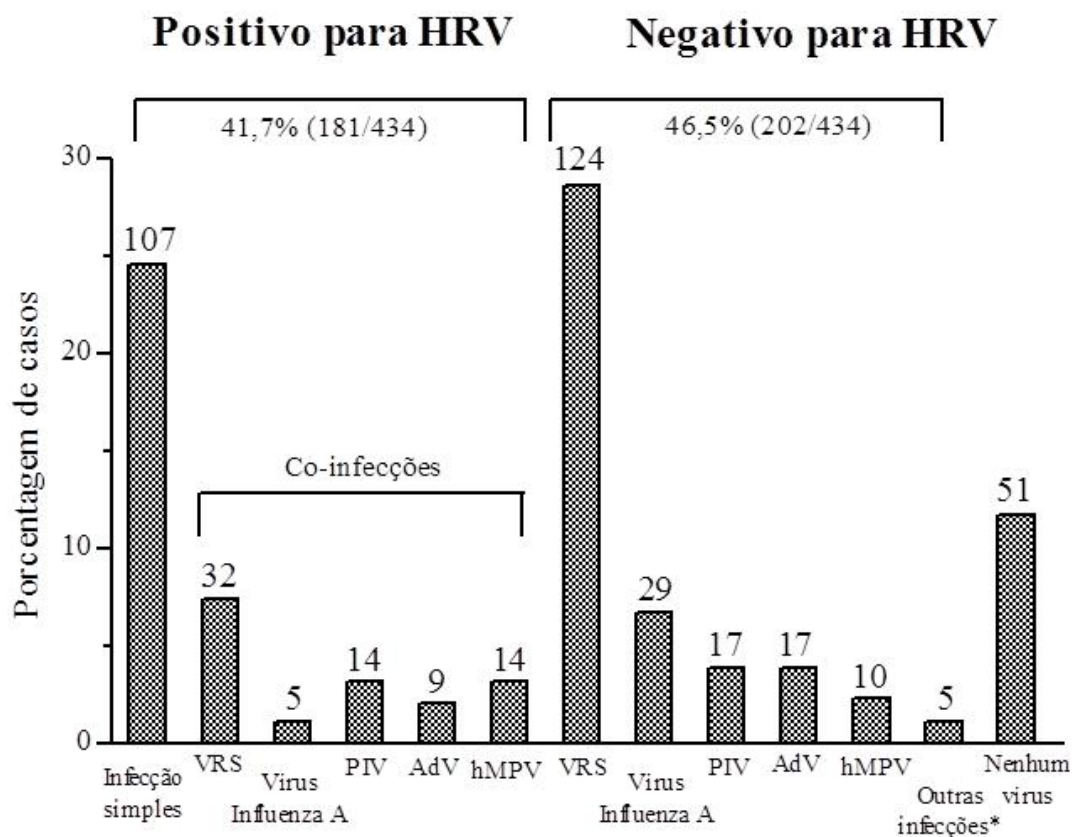


Figura 4. Distribuição de casos com vírus respiratórios detectados por IFI e/ou RT-PCR em amostras de crianças de até cinco anos de idade com infecção respiratória aguda. Os números mostrados sobre as colunas representam os respectivos números de casos.

*Um caso vírus influenza B; uma co-infecção AdV e VRS; AdV e vírus influenza A; AdV e PIV e VRS e PIV

A maioria das infecções simples pelo HRV resultou em sintomas brandos, enquanto que para os casos de co-infecções a frequência de casos moderados a graves aumentou (figura 5A). Isso deveu-se, principalmente, aos casos de co-infecção do HRV com VRS. Assim, excluindo-se da análise os casos de co-

infecção com o VRS, as porcentagens de casos brandos e moderados a graves (figura 5A: HRV co-infecção excluído VRS) foram similares às infecções simples pelos HRV, deixando de haver uma diferença estatisticamente significativa. Da mesma maneira, as frequências de casos brandos e de moderados a graves foram similares nos casos de co-infecções dos HRV com VRS e de infecções simples do VRS.

A gravidade dos sintomas clínicos foi refletida pelo local de infecção, envolvendo o TRS ou o TRI, inclusive nas análises de diferenças de casos entre os grupos. Neste aspecto, para os HRV em infecções simples, também foi constatado um predomínio de sintomas envolvendo o TRS, sendo que metade desses sintomas compreendeu resfriado comum e traqueobronquite (figura 5B).

Em contrapartida, mais de um terço dessas infecções acometeram o TRI, principalmente em casos de bronquiolite, bronquite sibilante e broncoespasmo. Excluindo-se os casos de VRS das co-infecções, novamente não houve diferença significativa com relação ao local de infecção em comparação com infecções simples pelos HRV, o mesmo sendo observado na avaliação comparativa de cada tipo de sintoma clínico. Assim, mais uma vez, a co-infecção do HRV com o VRS mostrou ser um fator associado ao aumento dos casos de infecção do TRI, tal como ocorreu em infecções simples pelo VRS.

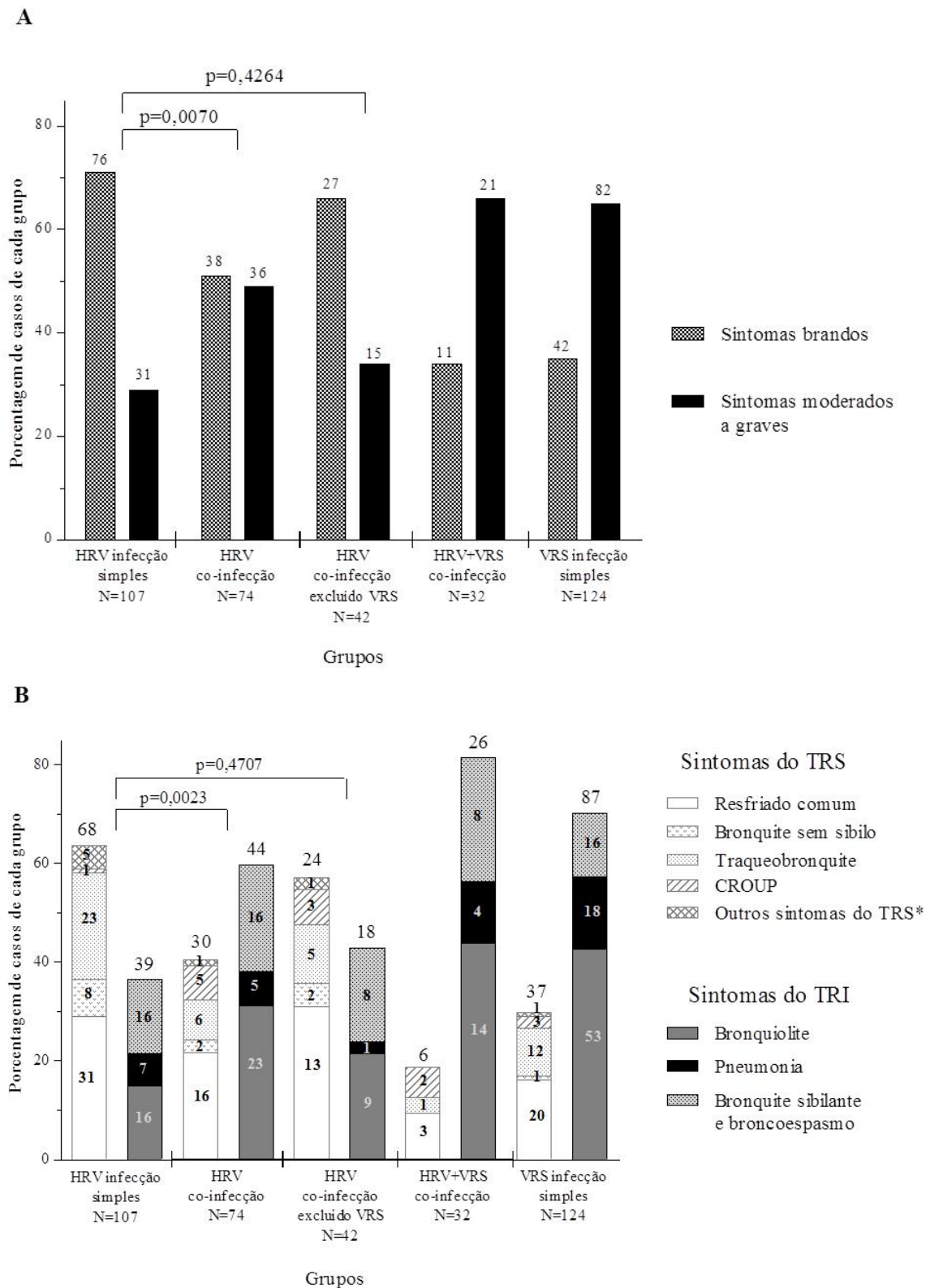


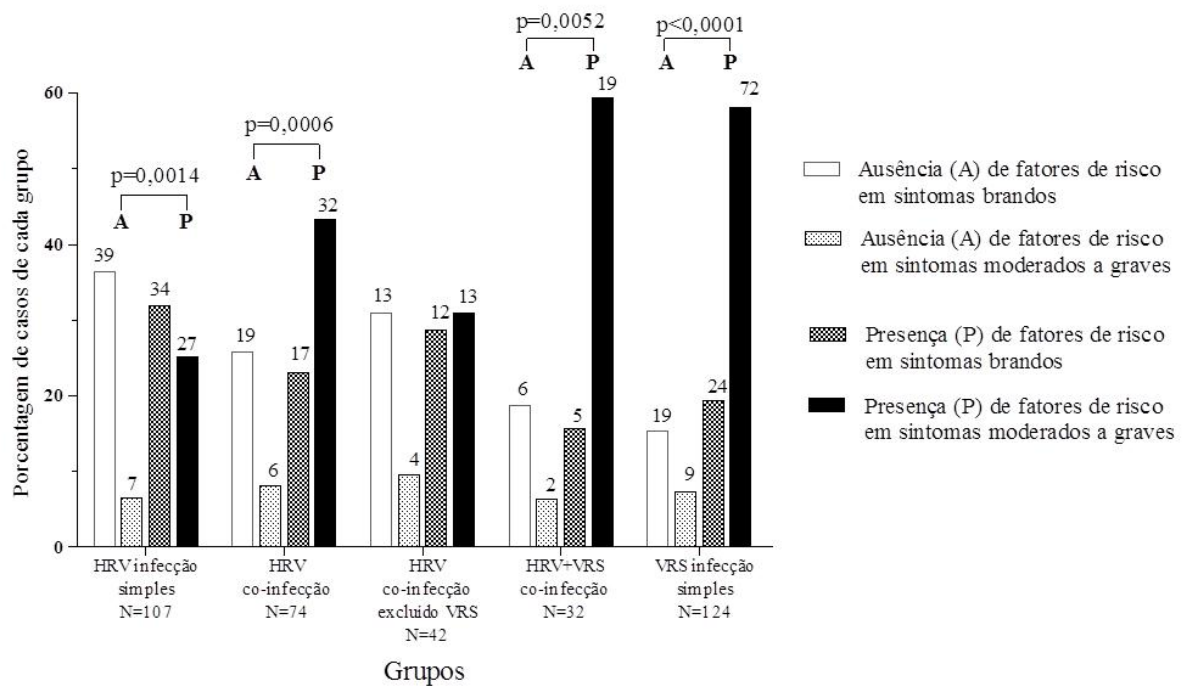
Figura 5. Distribuição de casos de acordo com a gravidade e local da infecção respiratória em crianças de até cinco anos de idade. A) gravidade dos sintomas clínicos e B) tipo de sintoma clínico. Os números mostrados no interior e sobre as colunas representam os respectivos números de casos.

*Laringite, laringotraqueobronquite e rinofaringite

Fatores de risco dos pacientes que poderiam estar associados ao agravamento de IRAs foram avaliados. Em infecções simples do HRV, observou-se aumento significativo dos casos moderados a graves na presença desses fatores (figura 6A). Cerca de 79,4% (27/34) de todos os casos moderados a graves ocorreram em crianças de até 12 meses de idade (figura 6, A e B).

Nas co-infecções também observou-se maior frequência de casos moderados a graves na presença dos possíveis fatores de risco avaliados (figura 6A), inclusive nos casos envolvendo co-infecção com o VRS, mas, excluindo-se as co-infecções com o VRS, a diferença não foi significativa.

A



B

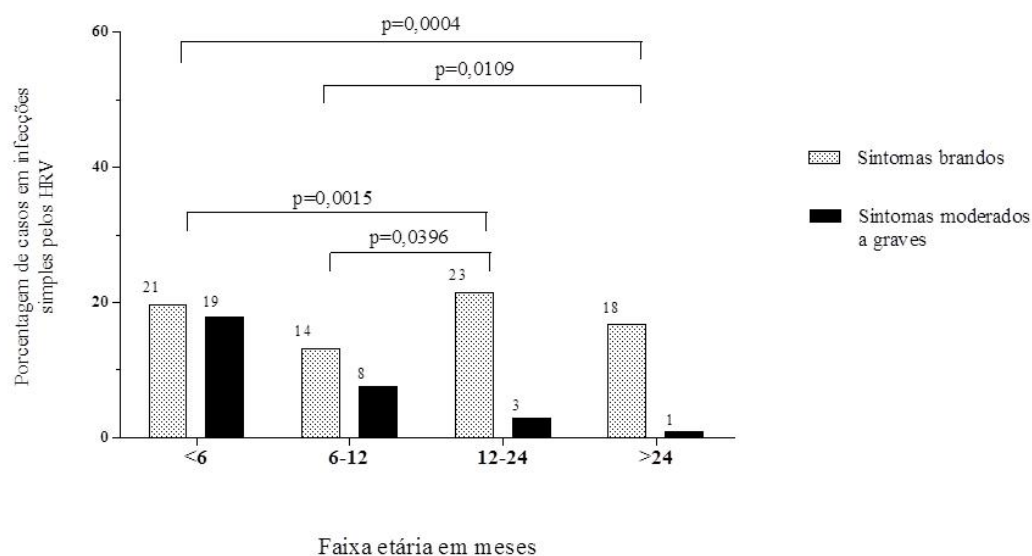


Figura 6. Distribuição de casos de acordo com presença de possíveis fatores de risco em crianças de até cinco anos de idade com infecção respiratória aguda. A) distribuição de casos de acordo com a gravidade dos sintomas clínicos e com presença de fatores de risco: tenra idade (crianças de até seis meses de idade), doenças cardíacas congênitas, prematuridade, doenças respiratórias não infecciosas e outras; B) distribuição etária dos casos de infecções simples pelos HRV. Os números mostrados sobre as colunas representam os respectivos números de casos.

Separadamente, prematuridade, cardiopatia e doença respiratória não infecciosa foram, em infecções simples do HRV, mais presentes em infecções moderadas a graves em relação às infecções sem fatores de risco (figura 7). A tenra idade exclusivamente, ou seja, excluindo-se os casos apresentando concomitantemente outros fatores de risco, em comparação com pacientes que não apresentaram fatores de risco, não se apresentou como importante fator de risco associado ao aumento da gravidade da doença. Porém, avaliando-se o fator etário juntamente com co-morbidades, tenra idade foi um fator importante no agravamento da doença (figura 6B).

Em co-infecções do HRV excluído o VRS, devido ao reduzido número de casos para análise dos fatores de risco individualmente, apenas cardiopatia apresentou associação com aumento da gravidade da infecção. A presença de doenças respiratórias não infecciosas não foi um fator significativo em infecções simples do VRS.

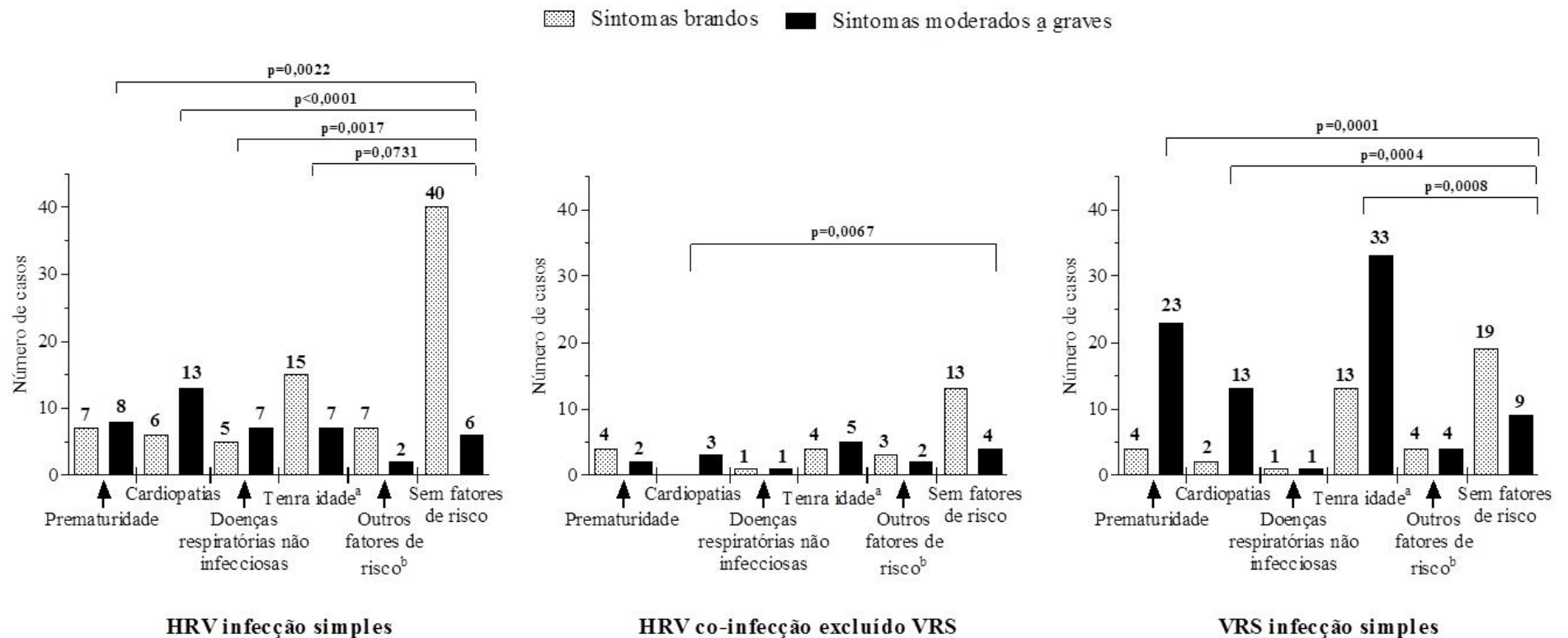


Figura 7. Distribuição do número de casos de acordo com os fatores de risco em infecções simples pelos HRV e VRS e co-infecções do HRV excluído VRS. Os números mostrados sobre as colunas representam os respectivos números de casos.

^aTenra idade: casos sem apresentação concomitante de outros fatores de risco

^bDoenças do sistema nervoso, tabagismo gestacional, anemia, atopia, atresia das vias biliares, adenomegalia, adenopatia cervical, hipertrofia adenomigdaliana, meduloblastoma, Síndrome do Intestino Curto, Síndrome de West, Síndrome de Down e meningomielocele

Para se avaliar uma possível associação da infecção por uma espécie específica dos HRV como fator envolvido em doença mais grave, foi possível analisar o sequenciamento dos *amplicons* dos HRV de 42 amostras clínicas (figura 8).

Sequência consensual
de aminoácidos da VP4

	STQNSVSSNGSSSLNYFNINVFDAASSGASKLDFSQDPSKFTDPVKDVLTKGIPTLQSPSEACGYSDRIKQITRGDSTITTQDQVANAVVAYGVNPH	
	10 20 30 40 50 60 70 80 90	
FJ445113 A8	...A..G.....R.....T.....I...T...S...I.....T	931
FJ445117 A13E.....E.....T.....I.....S.....G.....	941
FJ445190 A24E.....E.....T.....M.....S.....	946
FJ445125 A29E.....E.....T.....M.....S.....IG.....	937
FJ445126 A31	...M.....R.....E.....T.....M.....S.....G..I...	936
FJ445127 A32	...T.....E.....E.....T.....I.....S.....	935
FJ445111 AR.....E.....T.....M.....S.....G.....	929
63*	...M.....E.....E.....T.....I.....S.....	316
194	...A.....R.....R.....T.....I...N...S.....G...Q	402
238*	...G.....E.....E.....T.....I.....S.....G.....	362
250	...T.....E.....E.....T.....M.....S.....	409
316R.....T.....I.....S...I.....	409
305R.....T.....I.....FTRHSECCCLWCIAT	407
367*	...T.A.....R.....I.....N...S...I...GLWGYGP	342
378E.....E.....T.....I.....S.....	402
380	PP..A..G.....R.....T.....I.....T...S...I.....T	423
381*	QHKMQQMD.....E.....T.....I.....S.....G.....	330
387N...E.T.....E.....T.....I.....S.....	405
486N...E.T.....E.....T.....I.....S.....	297
493E.....E.....T.....I.....S.....G.....	410
550R.....E.....E.....T.....I.....S.....G.....	404
559	...A.....E.....E.....T.....I.....S.....G.....	400
560E.....E.....T.....I.....S.....G...CHI	403
564	...G.....R.....T.....I.....S...I.....	407
575	...G.....E.....E.....T.....I.....S.....G.....	396
577	...A.....LISI.....R.....I...N...S.....G.....	386
591	...A.....R.....I...N...S.....G...Q	291
611	...T.A.....N...R.....V.....I...N...S...I.....Q	400
Q875932 C	E.MFHAGS.AVVK...Y...S...LT.Q...Q.A.L.N--A.M...L...I.S...SV.TI...E..S	927
EF077280 C	ENSV.A.G..VIK...Y...S...LT.Q...Q.IA...N--A.M...T...F..L...I.N...SL.TI...E..E	860
EF186077 C	E.MIHAGT.AVVK...V..Y...LT.Q...Q.A.I.N--A.M...I...F..L...I.N...AV.TI...E..S	756
EF582387 C	E.MIHAGT.AVVK...V..Y...LT.Q...Q.A.I.SN--A.M...I...F..L...I.N...AV.TI...E..S	930
Q223227 C	ESAINAN..GVK...YR.S...LT.Q...Q.LV.T.N--A.M...G..F..L...I.N...ALHTIL...E..Q	938
66	DNAINA.S..VVK...Y...S...LT.Q...Q.LV.T.N--A.M...I...F..L...I.N...TL.TI...E..S	398
199	ENAITA...GLIK...Y...S...LA.Q...Q.LA...N--A.M...I...F..L...I.N...ALTRFWMVNGRN	396
205	ENTV.A...VIK...Y...S...LT.Q...Q.LV.T.N--A.M...T...F..L...I.N...SL.TI...E..Q	407
215	ENAITA...GLIK...Y...S...LA.Q...Q.LA...N--A.M...I...F..L...I.N...AL.TI...E..E	308
264	ENTITANK..IIR...Y...S...LT.Q...Q.LAEA.N--A.M...I...F..L...I.N...TL.TI...E..Q	393
273	ESAVTAT...GLIK...YR.S...LT.Q...Q.LV.T.N--A.M...I...F..L...I.N...AL.TI...E..R	400
297	ENSV.A.G..VIK...Y...S...LT.Q...Q.LV.T.N--A.M...T...F..L...I.N...SLHT...E..E	395
309	ENTV.TGS..IVK...Y...S...LT.Q...Q.LAEA.N--A.M...I...F..L...I.N...TL.S...AQ..E	395
315*	RIPLVQGVQDLSS...Y...S...LT.Q...Q.LAEA.N--A.M...I...F..L...I.N...TL.S...AQ..E	390
344	ENSITANK..IVK...Y...S...LT.Q...Q.LA.A.N--A.M...I...F..L...I.N...TL.S...E..Q	397
351	ENSV.A.G..VIK...Y...S...LT.Q...Q.IA...N--A.M...T...F..L...I.N...SL.TI...E..E	395
356	ENSV.A.G..VIK...Y...S...LT.Q...Q.IA...N--A.M...T...F..L...I.N...SL.TI...E..E	344
393*	EWCKQS...VIK...Y...S...L.RQ...Q.LV.T.N--A.M...I...F..L...I.N...SLHT.L...E..T	404
422	ENGVTAT...VIK...Y...S...L.RQ...Q.LV.T.N--A.M...I...F..L...I.N...SLHT.L...E..T	391
391	ENGVTAT...VIK...Y...S...L.RQ...Q.LV.T.N--A.M...I...F..L...I.N...SLHT.L...E..T	352
481	ENAITAN...GLIK...Y...S...LA.Q...Q.LA...N--A.M...I...F..L...I.N...AL.TI...E..E	398
469	ENIV.A...AVVK...Y...S...L.RQ...Q.LV.T.N--A.M...T...F..L...I.N...SL.S.L...E..T	395
535	ESGI.A.S..VIK...Y...S...L.Q...M..E..K.IAEM.N--A.M...I...F..L...I.N...TL.TI...E..E	342
609*	ESAVNATH.GLIK...YR.S...LT.Q...Q.LV.T.N--A.M...I...F..L...M.N...ALHT.L...E..Q	358
X80059 echovirus 11	E.GLNA.GS.IIH.T...Y...S...NS.NRQE...G...E...IMV.SL.A.N...A.E...VRS.L.N...ES.V..G.R..E	107
355	E.GLNA.GS.VIH.T...Y...S...NS.NRQE...G...E...IMV.SL.A.N...A.E...VRS.L.N...ES.V..G.R..E	351
V01149 polio	ENS.RAYG...TI...TT...YR.S...NA...Q...E.I...I.TA.M.N..NI...VL.L.L.N...EA..S...R..E	106
298	ENS.RAYG...TI...TT...YR.S...NA...Q...E.I...I.TA.M.N..NI...VL.L.L.N...EA..S...R..E	440

Figura 8. Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos realizado através do programa MegaAlign (DNASTAR), utilizando o método Clustal W, correspondente ao genoma da VP4 das amostras sequenciadas (indicadas por número) e de referência (representadas pelo nº de acesso do GenBank seguido da espécie). Estão evidenciados os aminoácidos divergentes da sequência consensual. A sequência nucleotídica utilizada na análise inicia-se na posição 644 e termina na posição 929, seguindo-se a numeração descrita por Palmenberg, *et al.* (2009). Quadro azul: HRV-A; quadro vermelho: HRV-C; setas: enterovírus.

*Amostras sequenciadas com um *primer* – HRVSAV(+): 63, 238, 315, 367, 381 e 609; PGEXFR: 393

A análise filogenética, realizada com as 42 sequências deduzidas de aminoácidos, permitiu determinar as espécies virais presentes nessas amostras (figura 9). Assim, as amostras foram identificadas como sendo 21 de HRV da espécie A, 19 da espécie C (50,0% e 45,2%, respectivamente) e duas de enterovírus. Estas últimas apresentaram alta similaridade com sequência de echovírus do sorotipo 11 (número de acesso ao GenBank X80059) e com a sequência da cepa vacinal do vírus da poliomielite (V01149), obtidas por busca utilizando BLAST. Neste último caso, a criança, além dos sintomas respiratórios, também apresentou convulsão. De acordo com consulta no prontuário médico do HC/UFU, nenhum agente bacteriano causador de meningite foi detectado neste caso. Nenhum HRV-B foi identificado neste estudo.

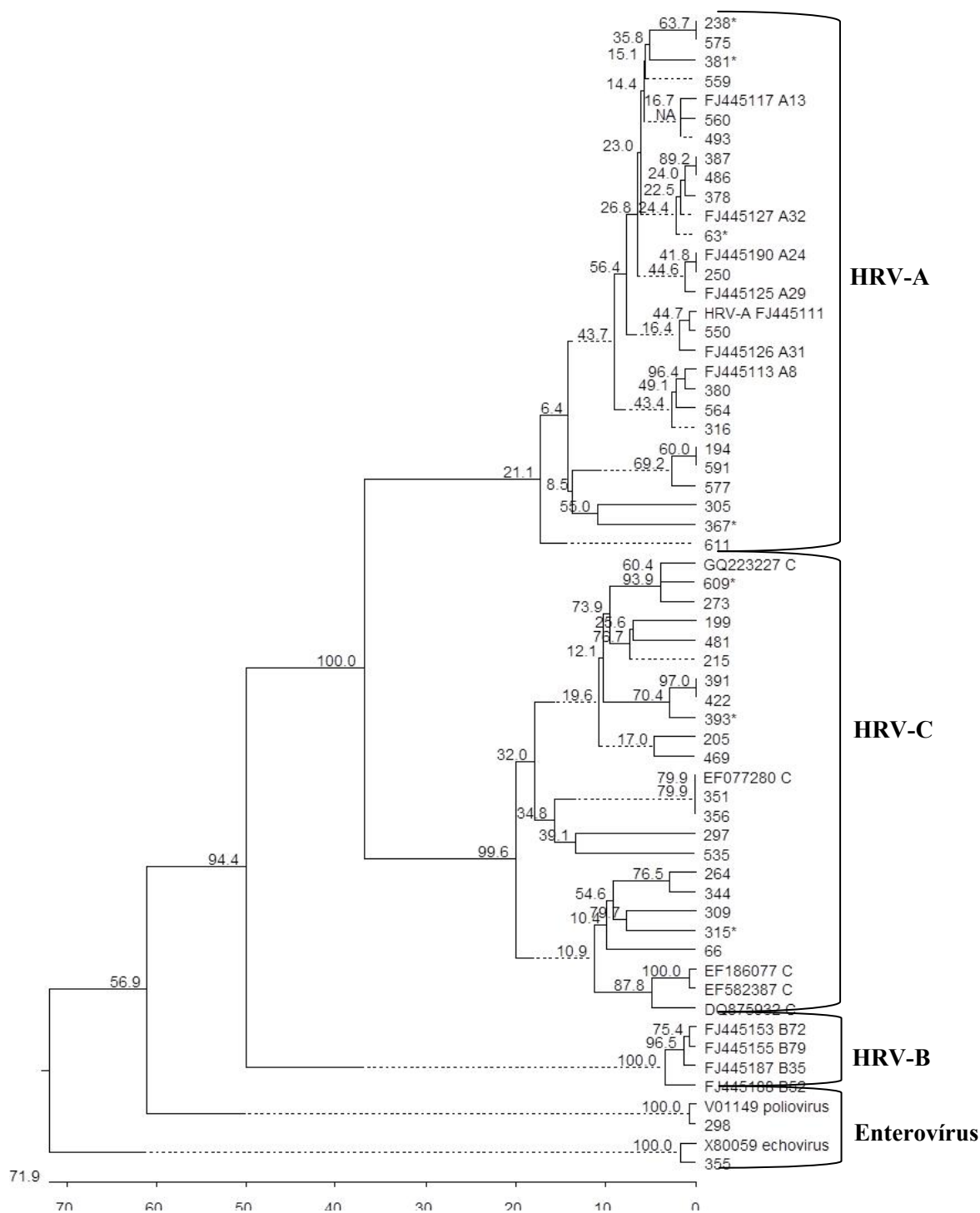


Figura 9. Árvore filogenética obtida pela sequência deduzida de aminoácidos a partir do sequenciamento da região VP4 das amostras de HRV encontradas. As sequências utilizadas foram as mesmas da figura 8. A escala indica as substituições de aminoácido por 100 resíduos; as amostras deste estudo estão indicadas por números e as cepas de referência estão identificadas pelo número de acesso ao GenBank seguida pela espécie ao qual ela pertence; árvore construída pelo programa MegaAlign pelo método neighbor-joining bootstrap 1000.

Com relação à associação de sintomas mais graves (figura 10), foram observadas frequências levemente mais altas nos casos envolvendo a espécie A, comparando-se os casos de infecção simples, co-infecção excluindo-se os casos com VRS, e a soma dos dois grupos. Porém, esses dados não foram estatisticamente significantes.

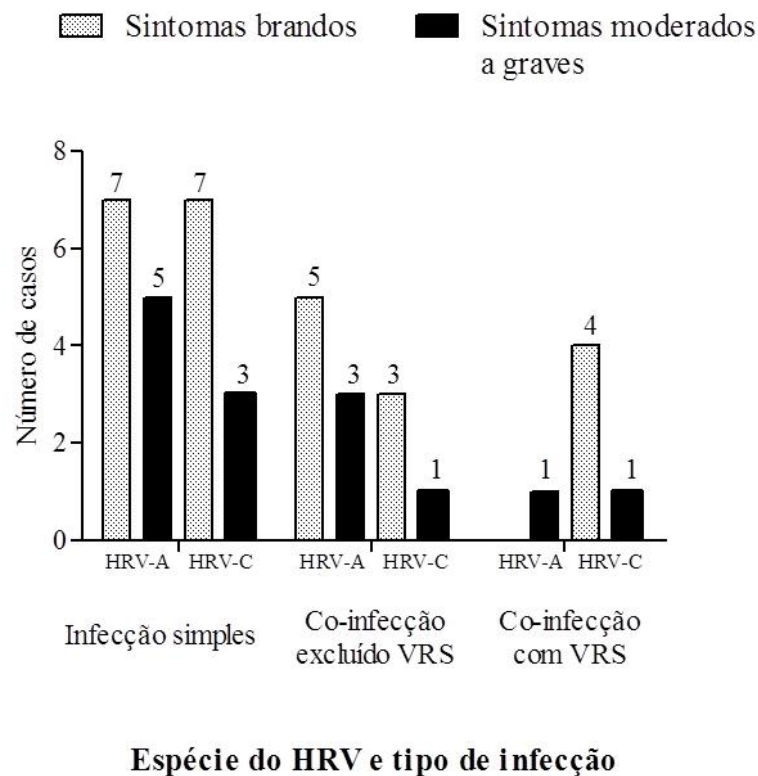


Figura 10. Distribuição do número de casos de HRV de acordo com a espécie viral e a gravidade dos sintomas. Os números mostrados sobre as colunas representam os respectivos números de casos.

Os sintomas clínicos mais comumente associados aos HRV-A foram bronquiolite e resfriado comum, respondendo por 38,1% (8/21) e 33,3% (7/21) dos casos, respectivamente. Enquanto que para os HRV-C, resfriado comum foi o sintoma clínico mais frequente – 42,1% (8/19).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram investigados possíveis fatores associados à apresentação de sintomas mais graves em crianças com até cinco anos de idade com infecção respiratória aguda causada pelos rinovírus humanos. Dentre os fatores do hospedeiro investigados, doenças respiratórias não infecciosas, prematuridade e cardiopatias congênitas foram responsáveis pelo agravamento dos sintomas respiratórios. Avaliando-se exclusivamente a tenra idade (crianças menores de seis meses de idade), apesar de não ter apresentado diferença significativa no agravamento dos sintomas clínicos em comparação ao grupo de crianças sem fatores de risco identificados, foi fator importante quando comparada com crianças maiores de um ano de idade quando avaliado com comorbidades.

Dentre os fatores referentes aos agentes infecciosos, co-infecção com o VRS foi o único fator encontrado que aumentou a gravidade da infecção. Entretanto, o aumento da gravidade clínica em virtude especificamente desta co-infecção muito provavelmente deve-se ao fato de o VRS ser reconhecidamente um agente associado com doença respiratória mais grave. Ainda assim, possivelmente a própria atuação dos HRV, independente da espécie, seja em infecções simples ou co-infecções com outros vírus, pode decorrer em sintomas mais graves.

Considerando que pelo menos um agente viral foi detectado por IFI e/ou RT-PCR em 88,2% das amostras avaliadas (figura 4), possivelmente os vírus constituíram o principal grupo de patógenos envolvidos nas infecções respiratórias agudas das crianças de até cinco anos de idade envolvidas neste estudo. Em outros relatos, o percentual de casos de infecções respiratórias virais também foi elevado, mesmo levando-se em conta as grandes variações de critérios aplicados em termos sazonais, metodológicos e clínicos. Em termos clínicos, por exemplo, a detecção de pelo menos um agente, variou de acordo com o estudo, de 67% a 95% em crianças com diversos tipos de sintomas clínicos e de gravidade de infecção (MARGUET, LUBRANO *et al.*, 2009;

CALVO, POZO *et al.*, 2010; FAIRCHOK, MARTIN *et al.*, 2010; FRANZ, ADAMS *et al.*, 2010).

Mesmo investigando um número menor de agentes virais em relação aos estudos citados acima, o elevado percentual de amostras com vírus respiratórios detectados neste estudo pode estar relacionado não apenas ao fato de terem sido incluídos os principais e mais frequentes vírus – HRV, VRS, vírus influenza A, PIV, AdV e hMPV, mas também por terem sido utilizadas duas metodologias de detecção, a IFI e (RT-)PCR, podendo esta última ter sido mais sensível na detecção de alguns vírus respiratórios (PARANHOS-BACCALA, KOMURIAN-PRADEL *et al.*, 2008).

Dentre os vírus mais detectados neste estudo, destacam-se os HRV e o VRS, com, respectivamente, 41,7% e 36,4% dos casos de infecções simples ou duplas (figura 1). Esta análise comparativa constitui um importante dado deste estudo, considerando que a elevada frequência de detecção dos HRV ser frequentemente associada com casos de co-infecção (PARANHOS-BACCALA, KOMURIAN-PRADEL *et al.*, 2008; CALVO, POZO *et al.*, 2010; BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011), sendo que neste estudo, a detecção dos HRV foi frequente tanto em termos de infecções simples quanto co-infecções. De fato, esses vírus vêm sendo apontados como o segundo mais detectado em crianças, após o VRS, porém em proporções menores em relação ao presente estudo, variando de 7,2% a 30,0% em infecções simples e em casos de co-infecções (MARGUET, LUBRANO *et al.*, 2009; CALVO, POZO *et al.*, 2010; BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011).

Entretanto, diferentes critérios podem ter influenciado essas variações de detecção dos HRV. Em todos os estudos mencionados acima, foram avaliadas crianças menores de dois anos de idade e hospitalizadas especificamente em decorrência de bronquiolite, sendo o VRS o mais frequentemente detectado. Em adição, BRAND, DE GROOT *et al.* (2011) inferiram que a elevada porcentagem de detecção do VRS em seu estudo pôde ter sido atribuída à inclusão de crianças atendidas somente no inverno, ou seja, no pico de circulação do VRS, e de pacientes hospitalizados, o que poderia constituir uma tendenciosidade nos

resultados. Dados potencialmente tendenciosos também foram abordados por PELTOLA, WARIS *et al.* (2009), cujo estudo incluiu apenas pacientes hospitalizados com sintomas clínicos envolvendo o TRI, sendo que os HRV foram os agentes mais frequentemente detectados, porém, não foi comparado a frequência dos casos graves com infecções brandas.

Por outro lado, em nosso estudo foram incluídas crianças com sintomas envolvendo tanto o TRI quanto TRS, hospitalizadas ou não, atendidas em diversos setores do HC/UFU e em algumas unidades de atendimento à saúde da cidade e em todos os meses do ano, que podem ter refletido no elevado percentual de crianças infectadas pelos HRV, pois esses agentes são causas de uma ampla gama de doenças respiratórias envolvendo sintomas do TRS e TRI (HEIKKINEN e JARVINEN, 2003; HAYDEN, 2004).

No entanto, deve ser levada em consideração a presença dos HRV em infecções assintomáticas, nas quais a detecção do agente pode não estar associada à doença respiratória (PELTOLA, WARIS *et al.*, 2008; VAN DER ZALM, VAN EWIJK *et al.*, 2009), mas sim com a presença de outro agente respiratório não detectado ou investigado. Entretanto, neste aspecto, vale ressaltar que o papel de alguns agentes virais no desencadeamento da doença respiratória permanece dúvida (ALLANDER, 2008). De qualquer forma, foi relatado que a detecção dos HRV foi mais frequente nos casos sintomáticos do que em assintomáticos, e mais ainda para aqueles com sintomas moderados a graves (JARTTI, LEE *et al.*, 2008).

A predominância, dentre os casos de co-infecção, da co-infecção HRV/VRS pode estar relacionada com a elevada frequência de detecção desses dois agentes, pois ambos têm sido apontados como os principais patógenos responsáveis por IRAs em crianças, assim como também foi observado neste estudo (figura 4) (PAPADOPOULOS, MOUSTAKI *et al.*, 2002; MARGUET, LUBRANO *et al.*, 2009; CALVO, POZO *et al.*, 2010; FRANZ, ADAMS *et al.*, 2010; BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011; MILLER, WILLIAMS *et al.*, 2011). Em adição, a sobreposição de período de maior circulação dos HRV e do VRS, de março a junho, pôde ter contribuído para este resultado, pois a maioria das co-

infecções ocorreu no mesmo período (dados não mostrados). Dados similares foram constatados por PARANHOS-BACCALÀ, KOMURIAN-PRADEL *et al.* (2008).

Com relação a co-infecções, GREER, MCERLEAN *et al.* (2009) reportaram que a detecção dos HRV estava associada com uma reduzida probabilidade de se detectar outros vírus respiratórios. Por outro lado, alguns autores constataram um aumento da gravidade clínica em decorrência de co-infecções (LINSUWANON, PAYUNGORN *et al.*, 2009; FRANZ, ADAMS *et al.*, 2010), enquanto outros não observaram tal relação (LAU, YIP *et al.*, 2007; GERNA, PIRALLA *et al.*, 2009; BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011). Neste estudo, os dados de co-infecção sugerem uma associação do aumento da gravidade dos sintomas clínicos somente nos casos de co-infecção com o VRS.

Possivelmente, a aplicação de diferentes critérios clínicos para determinar a gravidade das infecções respiratórias em diferentes grupos de pacientes possa influir nesses dados. MARGUET, LUBRANO *et al.* (2009), por exemplo, utilizaram um amplo espectro de definições clínicas para inferirem o nível de gravidade da infecção, porém incluíram apenas pacientes menores de um ano de idade e hospitalizados devido à bronquiolite, durante o inverno. Dessa forma, infecções simples pelo VRS e co-infecções entre HRV e VRS apresentaram escores de severidade maiores em relação às infecções simples pelo HRV. Diferentes parâmetros clínicos utilizados para definir gravidade de infecção, resultando em dados discrepantes, também foi discutido por PARANHOS-BACCALÀ, KOMURIAN-PRADEL *et al.* (2008).

De qualquer forma, a inclusão de mais de um critério pode fornecer dados mais precisos, como por exemplo, em alguns casos de sintomas brandos em que houve hospitalização, esta não estava relacionada à infecção respiratória, mas sim a um fator de risco que contribuiu para o agravamento da infecção branda. Neste aspecto, dos 34 casos de sintomas brandos pelo HRV com fatores de risco (figura 6A), 12 crianças (35,3%) foram hospitalizadas em decorrência do fator de risco, e não propriamente da condição respiratória.

Dessa forma, neste estudo foi incluída a associação de diversos critérios para se avaliar a gravidade da infecção, como hospitalização, necessidade de ventilação mecânica, local de atendimento e avaliação clínica, de acordo com a que foi utilizada em outros estudos (PARANHOS-BACCALA, KOMURIAN-PRADEL *et al.*, 2008; BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011).

A maioria das amostras incluídas neste estudo foi proveniente do HC/UFU, em virtude da proximidade de localização entre o hospital e o Laboratório de Virologia, onde as amostras clínicas foram avaliadas e estocadas. Em vista disso, vale ressaltar que o HC/UFU não recebe apenas atendimentos emergenciais e de urgência, pois o PAP é um setor do hospital que atende a populações de bairros vizinhos e do próprio hospital e de outras cidades onde há requerimento de atendimentos de baixa complexidade clínica, similarmente ao constatado nas unidades de atendimento à saúde.

Crianças infectadas com VRS, com ou sem co-infecção com HRV, foram atendidas predominantemente em locais que requereram de moderada a elevada complexidade de atendimento clínico (dados não mostrados). Em adição, a maioria dos atendimentos no berçário foi em decorrência de infecções pelo VRS. Estes dados demonstraram que as infecções pelo VRS são em sua maioria graves, afetando principalmente crianças de terna idade, de acordo com o que já foi demonstrado (FRYZEK, MARTONE *et al.*, 2011), além de sugerir um papel predominante deste vírus frente a infecções duplas com os HRV. De fato, CALVO, POZO *et al.* (2011) já haviam constatado que o VRS estava associado com um maior número de atendimentos em UTI do que outros agentes respiratórios e com perfil etário menor em relação aos HRV.

Condizente com os locais de atendimento, o presente estudo demonstrou que, com exceção das co-infecções envolvendo HRV e VRS, não houve aumento significativo da proporção de casos moderados a graves comparando-se as infecções simples dos HRV com as outras co-infecções (figura 5A). Quanto aos sintomas clínicos, nos quais foram observadas as ocorrências do comprometimento dos tratos respiratórios superior e inferior, as doenças do TRS foram mais frequentes tanto nas infecções simples pelo HRV como nas co-

infecções, excluído os casos de VRS (figura 5B), confirmando que os HRV são responsáveis em sua maioria por causar sintomas brandos (MACKAY, 2008; RUOHOLA, WARIS *et al.*, 2009).

Entretanto, muitos casos de bronquiolite e pneumonia foram observados, principalmente em crianças menores de seis meses de idade, em infecções simples dos HRV, corroborando a capacidade, já relatada em outros estudos, desses vírus em causar infecções do TRI (PAPADOPOULOS, MOUSTAKI *et al.*, 2002; MOSSER, VRTIS *et al.*, 2005; PARANHOS-BACCALA, KOMURIAN-PRADEL *et al.*, 2008; WOS, SANAK *et al.*, 2008; BRABEC-ZARUBA, PFANZAGL *et al.*, 2009; MARGUET, LUBRANO *et al.*, 2009; CALVO, POZO *et al.*, 2010; BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011). Esses casos, somados aos sintomas de bronquite sibilante e broncoespasmo são condizentes com os relatos referindo os HRV como uma das principais causas de chiado na infância tendo como resultados episódios subsequentes de asma (JARTTI, LEE *et al.*, 2008; LINSUWANON, PAYUNGPORN *et al.*, 2009; JARTTI E KORPPI, 2011).

Os resultados do no nosso estudo indicaram que a gravidade das doenças respiratórias, nos casos das co-infecções, está associada, em grande parte, às características do VRS, possivelmente pelo seu reconhecido papel em doenças do TRI (LAU, YIP *et al.*, 2007; GERNA, PIRALLA *et al.*, 2009; MARGUET, LUBRANO *et al.*, 2009; CALVO, POZO *et al.*, 2010; NASCIMENTO, SOUZA *et al.*, 2010; BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011).

Somado a isso, 79,4% dos pacientes com infecção moderada a grave nas infecções simples pelos HRV apresentou pelo menos um fator de risco (figura 6A). Esses fatores de risco também foram constatados por outros autores (COLIN, MCEVOY *et al.*, 2010; FRANZ, ADAMS *et al.*, 2010; BRAND, DE GROOT *et al.*, 2011).

Quanto ao fator etário, apesar de não ter sido observada uma diferença significativa entre o grupo que apresentou exclusivamente tenra idade com o grupo sem fatores de risco, crianças menores de seis meses de idade foi o grupo etário mais frequentemente afetado, com vários casos de sintomas envolvendo o

TRI, como bronquiolite e pneumonia (figura 7) e requereram intervenção de moderada a elevada complexidade clínica, inclusive hospitalizações. Porém, em comparação com faixas etárias de crianças maiores de 12 meses de idade, a diferença foi evidente (figura 6B). Apesar do papel que anticorpos maternos poderiam desempenhar frente às infecções pelos HRV (KELLNER, POPOW-KRAUPP *et al.*, 1991; SADEHARJU, KNIP *et al.*, 2007), possivelmente a maior frequência de casos moderados a graves em crianças dessa idade se deva pela imaturidade do sistema imunológico. De fato, crianças nesta faixa etária são mais vulneráveis às IRAs, mesmo na ausência de co-morbidades (PELTOLA, WARIS *et al.*, 2008; MARGUET, LUBRANO *et al.*, 2009; VAN DER ZALM, VAN EWIIK *et al.*, 2009).

Dentre as co-morbidades possivelmente envolvidas no agravamento da IRA, destacaram-se a prematuridade e, principalmente, doenças congênitas cardíacas (figura 7), associadas tanto a infecções pelo HRV quanto pelo VRS. A associação entre prematuridade e danos do trato respiratório foi constatada em um outro estudo, que demonstrou que baixa idade gestacional estava relacionada com elevada morbidade em casos de doença respiratória em crianças (COLIN, MCEVOY *et al.*, 2010). Em outro estudo envolvendo crianças prematuras extremas, foi relatado que uma elevada porcentagem de pacientes apresentava danos pulmonares em decorrência da referida condição, ocasionando uma maior vulnerabilidade às infecções respiratórias virais e com maior gravidade da doença (LAUGHON, ALLRED *et al.*, 2009).

Apesar de serem poucos os relatos descrevendo essas condições em infecções pelos HRV, alguns deles demonstraram aumento da gravidade clínica em infecções simples pelo agente associadas com doenças cardíacas congênitas e doença pulmonar crônica em decorrência da prematuridade e estão de acordo com nossos dados (MCGRATH-MORROW, LEE *et al.*, 2010; WATANABE, CARRARO *et al.*, 2010). Além disso, observamos também uma associação entre doenças respiratórias não infecciosas e o agravamento da infecção.

Para infecções causadas pelo VRS, prematuridade, doenças congênitas cardíacas e tenra idade foram predominantes entre as co-morbidades em casos de

sintomas moderados a graves, como também relatados em outros estudos (SIMOES, CARBONELL-ESTRANY *et al.*, 2008; THORBURN, 2009). A frequência da presença de fatores de risco em infecções moderadas a graves foi levemente superior nos casos de VRS (88,9%) do que nos casos de HRV (79,4%) (figura 6A). De fato, os fatores de risco frente às infecções pelo VRS parecem ser mais preponderantes, como relatados por outros estudos (SIMOES, CARBONELL-ESTRANY *et al.*, 2008; KRISTENSEN, STENSBALLE *et al.*, 2009; THORBURN, 2009; FRYZEK, MARTONE *et al.*, 2011; JUNG, 2011). Porém, deve-se considerar que para os HRV ainda faltam relatos que possam dimensionar com mais precisão a influência de co-morbidades nessas infecções.

Dessa forma, independentemente do agente viral causador da infecção, a prematuridade, cardiopatias, além do fator etário, são importantes no agravamento das IRAs, como demonstrado anteriormente, inclusive para os HRV (KRISTENSEN, STENSBALLE *et al.*, 2009; LAUGHON, ALLRED *et al.*, 2009; THORBURN, 2009; WATANABE, CARRARO *et al.*, 2010; JUNG, 2011). Entretanto, mesmo que não haja co-morbidades envolvidas nas IRAs, tenra idade por si só parece ser um importante fator de risco para o agravamento da doença respiratória, levando em conta que crianças menores de seis meses de idade, sem doenças de base, podem apresentar doença grave (MARGUET, LUBRANO *et al.*, 2009). Dessa forma, a faixa etária e co-morbidades parecem desempenhar papéis importantes na vulnerabilidade do TRI frente a infecções virais em crianças muito jovens, como sugerido em outro estudo (JARTTI E KORPPI, 2011).

No sequenciamento das espécies, a modificação do oligonucleotídeo HRVSAV(-) com a adição de uma sequência não relacionada ao genoma do HRV, foi realizada uma vez que o sequenciamento realizado com o oligonucleotídeo original apresentou baixa qualidade, pelo fato de ser degenerado. Dessa forma, 42 amostras tiveram a espécie do HRV identificada.

Assim, diferentes relatos demonstraram dados similares aos deste estudo (figura 9), nos quais as espécies A e C também foram as mais detectadas, independente do grupo de estudo avaliado (HAN, CHUNG *et al.*, 2009;

MILLER, EDWARDS *et al.*, 2009; PIRALLA, ROVIDA *et al.*, 2009). Apesar de vários relatos apontarem os HRV-C como uma espécie responsável por sintomas mais graves em relação às outras (LINSUWANON, PAYUNGORN *et al.*, 2009; MILLER, EDWARDS *et al.*, 2009; PIRALLA, ROVIDA *et al.*, 2009; BROBERG, NIEMELA *et al.*, 2011) nossos dados sugerem, apesar de não serem estatisticamente significantes, não haver diferenças nas frequências de gravidade de sintomas entre os HRV-A e HRV-C (figura 10) e estão de acordo com os dados relatados por MILLER, WILLIAMS *et al.* (2011) com relação à gravidade de bronquiolite. Além do mais, tanto para a espécie A quanto para C, resfriado comum foi um sintoma frequentemente observado, confirmando o caráter predominantemente brando das infecções por esses vírus, independentemente da espécie.

As similaridades entre infecções por estas duas espécies já foram relatadas anteriormente, em termos de manifestações clínicas, gravidade da doença e hospitalizações (XIANG, GONZALEZ *et al.*, 2010). Neste caso, apesar dos autores terem avaliado apenas crianças com pneumonia adquirida na comunidade, o estudo abrangeu tanto casos brandos quanto severos deste sintoma.

A identificação de um poliovírus de cepa vacinal chama atenção pelo fato de a amplificação por RT-PCR ter sido realizada com oligonucleotídeos direcionados para as sequências 5'UTR e VP2. Assim, os *primers*, as condições da reação de amplificação e, possivelmente, o título viral na amostra coletada provavelmente alteraram a especificidade do teste e possibilitaram a amplificação da sequência do genoma do poliovírus, uma vez que este agente pertence à mesma família dos HRV. Neste caso, a doença respiratória foi provavelmente causada pelo VRS, já que este vírus também foi detectado na amostra. Dessa forma, existe a possibilidade de que amostras de crianças recém-vacinadas contra poliomielite possam produzir resultados falso-positivos para HRV por RT-PCR. A sequência de outra amostra apresentou elevada similaridade com um echovírus, sendo que neste caso nenhum outro agente viral foi detectado.

6. CONCLUSÕES

Apesar dos HRV estarem associados principalmente com infecções respiratórias brandas, os resultados do presente estudo indicam que esses agentes também representam um dos mais importantes vírus envolvidos em casos moderados a graves em crianças de até cinco anos de idade.

Com relação aos fatores que podem levar ao aumento da gravidade das infecções pelos HRV, a presença do VRS, em co-infecções, mostrou-se importante. Além disso, nossos resultados sugerem que as co-infecções com outros vírus não estão associadas com aumento da gravidade das infecções pelos HRV. Apesar do que vem sendo relatado em alguns estudos, não constatamos diferença de frequência e de gravidade de sintomas entre as espécies A e C dos HRV. Porém, o número de amostras caracterizadas foi pequeno.

Além da atuação do fator virológico, alguns fatores apresentados pelos pacientes mostraram ser importantes no agravamento da doença causada pelo HRV. A prematuridade, as doenças respiratórias não infecciosas, a tenra idade e, principalmente, as doenças congênitas cardíacas foram preponderantes neste aspecto.

Apesar de diferentes relatos inferirem uma ampla gama de frequência de detecção dos HRV em infecções simples ou co-infecções, nosso estudo incluiu amostras baseando-se em critérios clínicos abrangentes, no que diz respeito à gravidade dos sintomas, casos de internações ou não, locais de atendimento e idade dos pacientes, com o objetivo de reduzir ou eliminar a possibilidade de se obter resultados tendenciosos.

Apesar disso, alguns aspectos do presente estudo podem ser mais bem avaliados em um futuro próximo. Por exemplo, uma avaliação mais detalhada dos fatores de risco pode trazer informações mais precisas, considerando que não foi possível levantar dados sobre aleitamento materno, contato das crianças com fumantes e outras doenças atópicas.

Em adição, o presente estudo não incluiu a avaliação de pacientes sem IRAs, o que poderia contribuir para um melhor entendimento dos HRV em

infecções assintomáticas e reforçar o papel desses agentes em infecções sintomáticas. Ainda, a ampliação das coletas das amostras nos postos de saúde municipal pode fornecer dados sobre a circulação desses vírus na comunidade como um todo. Por fim, a inclusão de outros agentes respiratórios, como CoV, hBoV e PIV-4, pode ampliar as análises de co-infecção dos HRV.

Dessa forma, a ampliação das análises mencionadas acima, bem como dos estudos sobre caracterização molecular dos HRV, incluindo mais amostras e estudos longitudinais, poderão contribuir para se conhecer melhor os fatores de risco que levam ao agravamento de IRAs em crianças infectadas pelos HRV, relacionados tanto ao vírus quanto ao paciente, além de aprimorar as informações epidemiológicas das infecções provocadas por esses agentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLANDER, T. Human bocavirus. **J Clin Virol**, v. 41, n. 1, p. 29-33, 2008.
- ARAÚJO, A. A., YOKOSAWA, J., DURIGON, E. L., VENTURA, A. M. Polymerase chain reaction detection of adenovirus DNA sequences in human lymphocytes. **Braz J Microbiol**, v. 32, p. 153-157, 2001.
- ARDEN, K. E.; FAUX, C. E.; O'NEILL, N. T.; MCERLEAN, P.; NITSCHKE, A.; LAMBERT, S. B.; NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. P.; MACKAY, I. M. Molecular characterization and distinguishing features of a novel human rhinovirus (HRV) C, HRVC-QCE, detected in children with fever, cough and wheeze during 2003. **J Clin Virol**, v. 47, n. 3, p. 219-23, 2010.
- ARDEN, K. E.; MACKAY, I. M. Newly identified human rhinoviruses: molecular methods heat up the cold viruses. **Rev Med Virol**, v. 20, n. 3, p. 156-76, 2010.
- ARDEN, K. E.; MCERLEAN, P.; NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. P.; MACKAY, I. M. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. **J Med Virol**, v. 78, n. 9, p. 1232-40, 2006.
- ARRUDA, E.; HAYDEN, F. G. Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR. **Mol Cell Probes**, v. 7, n. 5, p. 373-9, 1993.
- AYRES M, AYRES JR M, AYRES DL, SANTOS AAS. BioEstat – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Bio-médicas, Versão 3.0, Belém, Pará, Brasil. 2003.
- BARDIN, P. G.; SANDERSON, G.; ROBINSON, B. S.; HOLGATE, S. T.; TYRRELL, D. A. Experimental rhinovirus infection in volunteers. **Eur Respir J**, v. 9, n. 11, p. 2250-5, 1996.
- BELLEI, N.; CARRARO, E.; PEROSA, A.; WATANABE, A.; ARRUDA, E.; GRANATO, C. Acute respiratory infection and influenza-like illness viral etiologies in Brazilian adults. **J Med Virol**, v. 80, n. 10, p. 1824-7, 2008.
- BERTINO, J. S. Cost burden of viral respiratory infections: issues for formulary decision makers. **Am J Med**, v. 112 Suppl 6A, p. 42S-49S, 2002.
- BOCHKOV, Y. A.; HANSON, K. M.; KELES, S.; BROCKMAN-SCHNEIDER, R. A.; JARJOUR, N. N.; GERN, J. E. Rhinovirus-induced modulation of gene expression in bronchial epithelial cells from subjects with asthma. **Mucosal Immunol**, v. 3, n. 1, p. 69-80, 2010.

BRABEC-ZARUBA, M.; PFANZAGL, B.; BLAAS, D.; FUCHS, R. Site of human rhinovirus RNA uncoating revealed by fluorescent in situ hybridization. **J Virol**, v. 83, n. 8, p. 3770-7, 2009.

BRAND, H. K.; DE GROOT, R.; GALAMA, J. M.; BROUWER, M. L.; TEUWEN, K.; HERMANS, P. W.; MELCHERS, W. J.; WARRIS, A. Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis. **Pediatr Pulmonol**, 2011.

BRIESE, T.; RENWICK, N.; VENTER, M.; JARMAN, R. G.; GHOSH, D.; KONDGEN, S.; SHRESTHA, S. K.; HOEGH, A. M.; CASAS, I.; ADJOGOUA, E. V.; AKOUA-KOFFI, C.; MYINT, K. S.; WILLIAMS, D. T.; CHIDLOW, G.; VAN DEN BERG, R.; CALVO, C.; KOCH, O.; PALACIOS, G.; KAPOOR, V.; VILLARI, J.; DOMINGUEZ, S. R.; HOLMES, K. V.; HARNETT, G.; SMITH, D.; MACKENZIE, J. S.; ELLERBROK, H.; SCHWEIGER, B.; SCHONNING, K.; CHADHA, M. S.; LEENDERTZ, F. H.; MISHRA, A. C.; GIBBONS, R. V.; HOLMES, E. C.; LIPKIN, W. I. Global distribution of novel rhinovirus genotype. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 6, p. 944-7, 2008.

BROBERG, E.; NIEMELA, J.; LAHTI, E.; HYYPIA, T.; RUUSKANEN, O.; WARIS, M. Human rhinovirus C-associated severe pneumonia in a neonate. **J Clin Virol**, v. 51, n. 1, p. 79-82, 2011.

CALVO, C.; POZO, F.; GARCIA-GARCIA, M. L.; SANCHEZ, M.; LOPEZ-VALERO, M.; PEREZ-BRENA, P.; CASAS, I. Detection of new respiratory viruses in hospitalized infants with bronchiolitis: a three-year prospective study. **Acta Paediatr**, v. 99, n. 6, p. 883-7, 2010.

CATE, T. R.; COUCH, R. B.; JOHNSON, K. M. Studies with Rhinoviruses in Volunteers: Production of Illness, Effect of Naturally Acquired Antibody, and Demonstration of a Protective Effect Not Associated with Serum Antibody. **J Clin Invest**, v. 43, p. 56-67, 1964.

COLIN, A. A.; MCEVOY, C.; CASTILE, R. G. Respiratory morbidity and lung function in preterm infants of 32 to 36 weeks' gestational age. **Pediatrics**, v. 126, n. 1, p. 115-28, 2010.

COSTA, L. F.; YOKOSAWA, J.; MANTESE, O. C.; OLIVEIRA, T. F.; SILVEIRA, H. L.; NEPOMUCENO, L. L.; MOREIRA, L. S.; DYONISIO, G.; ROSSI, L. M.; OLIVEIRA, R. C.; RIBEIRO, L. Z.; QUEIROZ, D. A. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlandia, MG, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 301-6, 2006.

DE BOECK, K.; VAN DER AA, N.; VAN LIERDE, S.; CORBEEL, L.; EECKELS, R. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: a double-blind dexamethasone efficacy study. **J Pediatr**, v. 131, n. 6, p. 919-21, 1997.

DRESCHERS, S.; DUMITRU, C. A.; ADAMS, C.; GULBINS, E. The cold case: are rhinoviruses perfectly adapted pathogens? **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 2, p. 181-91, 2007.

ECHEVARRIA, J. E.; ERDMAN, D. D.; SWIERKOSZ, E. M.; HOLLOWAY, B. P.; ANDERSON, L. J. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 5, p. 1388-91, 1998.

FAIRCHOK, M. P.; MARTIN, E. T.; CHAMBERS, S.; KUYPERS, J.; BEHRENS, M.; BRAUN, L. E.; ENGLUND, J. A. Epidemiology of viral respiratory tract infections in a prospective cohort of infants and toddlers attending daycare. **J Clin Virol**, v. 49, n. 1, p. 16-20, 2010.

FAUX, C. E.; ARDEN, K. E.; LAMBERT, S. B.; NISSEN, M. D.; NOLAN, T. M.; CHANG, A. B.; SLOOTS, T. P.; MACKAY, I. M. Usefulness of published PCR primers in detecting human rhinovirus infection. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 2, p. 296-8, 2011.

FENDRICK, A. M.; MONTO, A. S.; NIGHTENGALE, B.; SARNES, M. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. **Arch Intern Med**, v. 163, n. 4, p. 487-94, 2003.

FRANZ, A.; ADAMS, O.; WILLEMS, R.; BONZEL, L.; NEUHAUSEN, N.; SCHWEIZER-KRANTZ, S.; RUGGEBERG, J. U.; WILLERS, R.; HENRICH, B.; SCHROTEN, H.; TENENBAUM, T. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. **J Clin Virol**, v. 48, n. 4, p. 239-45, 2010.

FRYZEK, J. P.; MARTONE, W. J.; GROOTHUIS, J. R. Trends in chronologic age and infant respiratory syncytial virus hospitalization: an 8-year cohort study. **Adv Ther**, v. 28, n. 3, p. 195-201, 2011.

GAMA, R. E.; HORSNELL, P. R.; HUGHES, P. J.; NORTH, C.; BRUCE, C. B.; AL-NAKIB, W.; STANWAY, G. Amplification of rhinovirus specific nucleic acids from clinical samples using the polymerase chain reaction. **J Med Virol**, v. 28, n. 2, p. 73-7, 1989.

GAMA, R. E.; HUGHES, P. J.; BRUCE, C. B.; STANWAY, G. Polymerase chain reaction amplification of rhinovirus nucleic acids from clinical material. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 19, p. 9346, 1988.

GERN, J. E. The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma. **J Virol**, v. 84, n. 15, p. 7418-26, 2010.

GERN, J. E.; BUSSE, W. W. Association of rhinovirus infections with asthma. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 1, p. 9-18, 1999.

GERNA, G.; PIRALLA, A.; ROVIDA, F.; ROGNONI, V.; MARCHI, A.; LOCATELLI, F.; MELONI, F. Correlation of rhinovirus load in the respiratory tract and clinical symptoms in hospitalized immunocompetent and immunocompromised patients. **J Med Virol**, v. 81, n. 8, p. 1498-507, 2009.

GREER, R. M.; MCERLEAN, P.; ARDEN, K. E.; FAUX, C. E.; NITSCHKE, A.; LAMBERT, S. B.; NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. P.; MACKAY, I. M. Do rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract infections? **J Clin Virol**, v. 45, n. 1, p. 10-5, 2009.

GREVE, J. M.; DAVIS, G.; MEYER, A. M.; FORTE, C. P.; YOST, S. C.; MARLOR, C. W.; KAMARCK, M. E.; MCCLELLAND, A. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. **Cell**, v. 56, n. 5, p. 839-47, 1989.

HAMPARIAN, V. V.; COLONNO, R. J.; COONEY, M. K.; DICK, E. C.; GWALTNEY, J. M., JR.; HUGHES, J. H.; JORDAN, W. S., JR.; KAPIKIAN, A. Z.; MOGABGAB, W. J.; MONTANO, A. A collaborative report: rhinoviruses-extension of the numbering system from 89 to 100. **Virology**, v. 159, n. 1, p. 191-2, 1987.

HAN, T. H.; CHUNG, J. Y.; HWANG, E. S.; KOO, J. W. Detection of human rhinovirus C in children with acute lower respiratory tract infections in South Korea. **Arch Virol**, v. 154, n. 6, p. 987-91, 2009.

HAYDEN, F. G. Rhinovirus and the lower respiratory tract. **Rev Med Virol**, v. 14, n. 1, p. 17-31, 2004.

HEIKKINEN, T.; JARVINEN, A. The common cold. **Lancet**, v. 361, n. 9351, p. 51-9, 2003.

JACKSON, D. J.; GANGNON, R. E.; EVANS, M. D.; ROBERG, K. A.; ANDERSON, E. L.; PAPPAS, T. E.; PRINTZ, M. C.; LEE, W. M.; SHULT, P. A.; REISDORF, E.; CARLSON-DAKES, K. T.; SALAZAR, L. P.; DASILVA, D. F.; TISLER, C. J.; GERN, J. E.; LEMANSKE, R. F., JR. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 178, n. 7, p. 667-72, 2008.

JACQUES, J.; BOUSCAMPBART-DUCHAMP, M.; MORET, H.; CARQUIN, J.; BRODARD, V.; LINA, B.; MOTTE, J.; ANDREOLETTI, L. Association of

respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. **J Clin Virol**, v. 35, n. 4, p. 463-6, 2006.

JARTTI, T.; KORPPI, M. Rhinovirus-induced bronchiolitis and asthma development. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 22, n. 4, p. 350-5, 2011.

JARTTI, T.; PAUL-ANTTILA, M.; LEHTINEN, P.; PARIKKA, V.; VUORINEN, T.; SIMELL, O.; RUUSKANEN, O. Systemic T-helper and T-regulatory cell type cytokine responses in rhinovirus vs. respiratory syncytial virus induced early wheezing: an observational study. **Respir Res**, v. 10, p. 85, 2009.

JARTTI, T.; LEE, W. M.; PAPPAS, T.; EVANS, M.; LEMANSKE, R. F., JR.; GERN, J. E. Serial viral infections in infants with recurrent respiratory illnesses. **Eur Respir J**, v. 32, n. 2, p. 314-20, 2008.

JUNG, J. W. Respiratory syncytial virus infection in children with congenital heart disease: global data and interim results of Korean RSV-CHD survey. **Korean J Pediatr**, v. 54, n. 5, p. 192-6, 2011.

KELLNER, G.; POPOW-KRAUPP, T.; BINDER, C.; GOEDL, I.; KUNDI, M.; KUNZ, C. Respiratory tract infections due to different rhinovirus serotypes and the influence of maternal antibodies on the clinical expression of the disease in infants. **J Med Virol**, v. 35, n. 4, p. 267-72, 1991.

KELLY, J. T.; BUSSE, W. W. Host immune responses to rhinovirus: mechanisms in asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 122, n. 4, p. 671-82; quiz 683-4, 2008.

KIRCHBERGER, S.; MAJDIC, O.; STOCKL, J. Modulation of the immune system by human rhinoviruses. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 142, n. 1, p. 1-10, 2007.

KISTLER, A. L.; WEBSTER, D. R.; ROUSKIN, S.; MAGRINI, V.; CREDLE, J. J.; SCHNURR, D. P.; BOUSHEY, H. A.; MARDIS, E. R.; LI, H.; DERISI, J. L. Genome-wide diversity and selective pressure in the human rhinovirus. **Virol J**, v. 4, p. 40, 2007.

KOTANIEMI-SYRJANEN, A.; VAINIONPAA, R.; REIJONEN, T. M.; WARIS, M.; KORHONEN, K.; KORPPI, M. Rhinovirus-induced wheezing in infancy-the first sign of childhood asthma? **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 1, p. 66-71, 2003.

KRISTENSEN, K.; STENSBALLE, L. G.; BJERRE, J.; ROTH, D.; FISKE, N.; KONGSTAD, T.; SVENDSEN, A. L.; NIELSEN, B. W. Risk factors for

respiratory syncytial virus hospitalisation in children with heart disease. **Arch Dis Child**, v. 94, n. 10, p. 785-9, 2009.

LAU, S. K.; YIP, C. C.; TSOI, H. W.; LEE, R. A.; SO, L. Y.; LAU, Y. L.; CHAN, K. H.; WOO, P. C.; YUEN, K. Y. Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 11, p. 3655-64, 2007.

LAUGHON, M.; ALLRED, E. N.; BOSE, C.; O'SHEA, T. M.; VAN MARTER, L. J.; EHRENKRANZ, R. A.; LEVITON, A. Patterns of respiratory disease during the first 2 postnatal weeks in extremely premature infants. **Pediatrics**, v. 123, n. 4, p. 1124-31, 2009.

LEE, W. M.; KIESNER, C.; PAPPAS, T.; LEE, I.; GRINDLE, K.; JARTTI, T.; JAKIELA, B.; LEMANSKE, R. F., JR.; SHULT, P. A.; GERN, J. E. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. **PLoS One**, v. 2, n. 10, p. e966, 2007.

LEWIS-ROGERS, N.; BENDALL, M. L.; CRANDALL, K. A. Phylogenetic relationships and molecular adaptation dynamics of human rhinoviruses. **Mol Biol Evol**, v. 26, n. 5, p. 969-81, 2009.

LINSUWANON, P.; PAYUNGPORN, S.; SAMRANSAMRUAJKIT, R.; THEAMBOONLERS, A.; POOVORAWAN, Y. Recurrent human rhinovirus infections in infants with refractory wheezing. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 6, p. 978-80, 2009.

LOPEZ-SOUZA, N.; FAVORETO, S.; WONG, H.; WARD, T.; YAGI, S.; SCHNURR, D.; FINKBEINER, W. E.; DOLGANOV, G. M.; WIDDICOMBE, J. H.; BOUSHEY, H. A.; AVILA, P. C. In vitro susceptibility to rhinovirus infection is greater for bronchial than for nasal airway epithelial cells in human subjects. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 6, p. 1384-90 e2, 2009.

MACKAY, I. M. Human rhinoviruses: the cold wars resume. **J Clin Virol**, v. 42, n. 4, p. 297-320, 2008.

MANOHA, C.; ESPINOSA, S.; AHO, S. L.; HUET, F.; POTHIER, P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. **J Clin Virol**, v. 38, n. 3, p. 221-6, 2007.

MARGUET, C.; LUBRANO, M.; GUEUDIN, M.; LE ROUX, P.; DESCHILDRE, A.; FORGET, C.; COUDERC, L.; SIRET, D.; DONNOU, M. D.; BUBENHEIM, M.; VABRET, A.; FREYMUTH, F. In very young infants

severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4596, 2009.

MCERLEAN, P.; SHACKELTON, L. A.; LAMBERT, S. B.; NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. P.; MACKAY, I. M. Characterisation of a newly identified human rhinovirus, HRV-QPM, discovered in infants with bronchiolitis. **J Clin Virol**, v. 39, n. 2, p. 67-75, 2007.

MCGRATH-MORROW, S. A.; LEE, G.; STEWART, B. H.; MCGINLEY, B. M.; LEFTON-GREIF, M. A.; OKELO, S. O.; COLLACO, J. M. Day care increases the risk of respiratory morbidity in chronic lung disease of prematurity. **Pediatrics**, v. 126, n. 4, p. 632-7, 2010.

MCINTYRE, C. L.; MCWILLIAM LEITCH, E. C.; SAVOLAINEN-KOPRA, C.; HOVI, T.; SIMMONDS, P. Analysis of genetic diversity and sites of recombination in human rhinovirus species C. **J Virol**, v. 84, n. 19, p. 10297-310, 2010.

MILLER, E. K.; WILLIAMS, J. V.; GEBRETSADIK, T.; CARROLL, K. N.; DUPONT, W. D.; MOHAMED, Y. A.; MORIN, L. L.; HEIL, L.; MINTON, P. A.; WOODWARD, K.; LIU, Z.; HARTERT, T. V. Host and viral factors associated with severity of human rhinovirus-associated infant respiratory tract illness. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 4, p. 883-91, 2011.

MILLER, E. K.; EDWARDS, K. M.; WEINBERG, G. A.; IWANE, M. K.; GRIFFIN, M. R.; HALL, C. B.; ZHU, Y.; SZILAGYI, P. G.; MORIN, L. L.; HEIL, L. H.; LU, X.; WILLIAMS, J. V. A novel group of rhinoviruses is associated with asthma hospitalizations. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 1, p. 98-104 e1, 2009.

MILLER, E. K.; LU, X.; ERDMAN, D. D.; POEHLING, K. A.; ZHU, Y.; GRIFFIN, M. R.; HARTERT, T. V.; ANDERSON, L. J.; WEINBERG, G. A.; HALL, C. B.; IWANE, M. K.; EDWARDS, K. M. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. **J Infect Dis**, v. 195, n. 6, p. 773-81, 2007.

MIRAZO, S.; RUCHANSKY, D.; BLANC, A.; ARBIZA, J. Serologic evidence of human metapneumovirus circulation in Uruguay. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 715-8, 2005.

MONTO, A. S. Epidemiology of viral respiratory infections. **Am J Med**, v. 112 Suppl 6A, p. 4S-12S, 2002.

MOSSER, A. G.; VRTIS, R.; BURCHELL, L.; LEE, W. M.; DICK, C. R.; WEISSHAAR, E.; BOCK, D.; SWENSON, C. A.; CORNWELL, R. D.; MEYER, K. C.; JARJOUR, N. N.; BUSSE, W. W.; GERN, J. E. Quantitative

and qualitative analysis of rhinovirus infection in bronchial tissues. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, n. 6, p. 645-51, 2005.

NASCIMENTO, M. S.; SOUZA, A. V.; FERREIRA, A. V.; RODRIGUES, J. C.; ABRAMOVICI, S.; SILVA FILHO, L. V. High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 65, n. 11, p. 1133-7, 2010.

NOKSO-KOIVISTO, J.; PITKARANTA, A.; BLOMQVIST, S.; JOKINEN, J.; KLEEMOLA, M.; TAKALA, A.; KILPI, T.; HOVI, T. Viral etiology of frequently recurring respiratory tract infections in children. **Clin Infect Dis**, v. 35, n. 5, p. 540-6, 2002.

OLIVEIRA, T. F.; FREITAS, G. R.; RIBEIRO, L. Z.; YOKOSAWA, J.; SIQUEIRA, M. M.; PORTES, S. A.; SILVEIRA, H. L.; CALEGARI, T.; COSTA, L. F.; MANTESE, O. C.; QUEIROZ, D. A. Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clinicas of Uberlandia, MG, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 417-22, 2008.

PALMENBERG, A. C.; SPIRO, D.; KUZMICKAS, R.; WANG, S.; DJIKENG, A.; RATHE, J. A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; LIGGETT, S. B. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. **Science**, v. 324, n. 5923, p. 55-9, 2009.

PAPADOPOULOS, N. G.; MOUSTAKI, M.; TSOLIA, 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**, v. 165, n. 9, p. 1285-9, 2002.

PARANHOS-BACCALA, G.; KOMURIAN-PRADEL, F.; RICHARD, N.; VERNET, G.; LINA, B.; FLORET, D. Mixed respiratory virus infections. **J Clin Virol**, v. 43, n. 4, p. 407-10, 2008.

PELTOLA, V.; WARIS, M.; OSTERBACK, R.; SUSI, P.; HYYPIA, T.; RUUSKANEN, O. Clinical effects of rhinovirus infections. **J Clin Virol**, v. 43, n. 4, p. 411-4, 2008.

PIRALLA, A.; ROVIDA, F.; CAMPANINI, G.; ROGNONI, V.; MARCHI, A.; LOCATELLI, F.; GERNA, G. Clinical severity and molecular typing of human rhinovirus C strains during a fall outbreak affecting hospitalized patients. **J Clin Virol**, v. 45, n. 4, p. 311-7, 2009.

PRICE, W. H. The Isolation of a New Virus Associated with Respiratory Clinical Disease in Humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 42, n. 12, p. 892-6, 1956.

QUEIROZ, D. A.; DURIGON, E. L.; BOTOSSO, V. F.; EJZEMBERG, B.; VIEIRA, S. E.; MINEO, J. R.; YAMASHITA, C.; HEIN, N.; LOPES, C. L.; CACHARO, A. L.; STEWIEN, K. E. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 10, p. 1183-93, 2002.

ROTBART, H. A.; HAYDEN, F. G. Picornavirus infections: a primer for the practitioner. **Arch Fam Med**, v. 9, n. 9, p. 913-20, 2000.

RUOHOLA, A.; WARIS, M.; ALLANDER, T.; ZIEGLER, T.; HEIKKINEN, T.; RUUSKANEN, O. Viral etiology of common cold in children, Finland. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 2, p. 344-6, 2009.

SADEHARJU, K.; KNIP, M.; VIRTANEN, S. M.; SAVILAHTI, E.; TAURIAINEN, S.; KOSKELA, P.; AKERBLOM, H. K.; HYOTY, H. Maternal antibodies in breast milk protect the child from enterovirus infections. **Pediatrics**, v. 119, n. 5, p. 941-6, 2007.

SAVOLAINEN-KOPRA, C.; BLOMQVIST, S.; SMURA, T.; ROIVAINEN, M.; HOVI, T.; KIANG, D.; KALRA, I.; YAGI, S.; LOUIE, J. K.; BOUSHEY, H.; BOOTHBY, J.; SCHNURR, D. P. 5' noncoding region alone does not unequivocally determine genetic type of human rhinovirus strains. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 4, p. 1278-80, 2009.

SAVOLAINEN, C.; BLOMQVIST, S.; MULDER, M. N.; HOVI, T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. **J Gen Virol**, v. 83, n. Pt 2, p. 333-40, 2002.

SAVOLAINEN, C.; MULDER, M. N.; HOVI, T. Phylogenetic analysis of rhinovirus isolates collected during successive epidemic seasons. **Virus Res**, v. 85, n. 1, p. 41-6, 2002.

SHARFSTEIN, J. M.; NORTH, M.; SERWINT, J. R. Over the counter but no longer under the radar--pediatric cough and cold medications. **N Engl J Med**, v. 357, n. 23, p. 2321-4, 2007.

SIMMONDS, P.; MCINTYRE, C.; SAVOLAINEN-KOPRA, C.; TAPPAREL, C.; MACKAY, I. M.; HOVI, T. Proposals for the classification of human rhinovirus species C into genotypically assigned types. **J Gen Virol**, v. 91, n. Pt 10, p. 2409-19, 2010.

SIMÕES, E. A.; CARBONELL-ESTRANY, X.; FULLARTON, J. R.; LIESE, J. G.; FIGUERAS-ALOY, J.; DOERING, G.; GUZMAN, J. A predictive model for respiratory syncytial virus (RSV) hospitalisation of premature infants born at 33-35 weeks of gestational age, based on data from the Spanish FLIP Study. **Respir Res**, v. 9, p. 78, 2008.

SIMONS, E.; SCHROTH, M. K.; GERN, J. E. Analysis of tracheal secretions for rhinovirus during natural colds. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 16, n. 3, p. 276-8, 2005.

STANWAY, G.; HUGHES, P. J.; MOUNTFORD, R. C.; MINOR, P. D.; ALMOND, J. W. The complete nucleotide sequence of a common cold virus: human rhinovirus 14. **Nucleic Acids Res**, v. 12, n. 20, p. 7859-75, 1984.

STOCKTON, J.; ELLIS, J. S.; SAVILLE, M.; CLEWLEY, J. P.; ZAMBON, M. C. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 10, p. 2990-5, 1998.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol**, v. 28, n. 10, p. 2731-9, 2011.

TAPPAREL, C.; JUNIER, T.; GERLACH, D.; CORDEY, S.; VAN BELLE, S.; PERRIN, L.; ZDOBNOV, E. M.; KAISER, L. New complete genome sequences of human rhinoviruses shed light on their phylogeny and genomic features. **BMC Genomics**, v. 8, p. 224, 2007.

TAUSSIG, L. M.; CASTRO, O.; BEAUDRY, P. H.; FOX, W. W.; BUREAU, M. Treatment of laryngotracheobronchitis (croup). Use of intermittent positive-pressure breathing and racemic epinephrine. **Am J Dis Child**, v. 129, n. 7, p. 790-3, Jul 1975.

THORBURN, K. Pre-existing disease is associated with a significantly higher risk of death in severe respiratory syncytial virus infection. **Arch Dis Child**, v. 94, n. 2, p. 99-103, 2009.

VAN BENTEN, I.; KOOPMAN, L.; NIESTERS, B.; HOP, W.; VAN MIDDELKOOP, B.; DE WAAL, L.; VAN DRUNEN, K.; OSTERHAUS, A.; NEIJENS, H.; FOKKENS, W. Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 14, n. 5, p. 363-70, 2003.

VAN DER ZALM, M. M.; VAN EWIK, B. E.; WILBRINK, B.; UITERWAAL, C. S.; WOLFS, T. F.; VAN DER ENT, C. K. Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. **J Pediatr**, v. 154, n. 3, p. 396-400, 400 e1, 2009.

WATANABE, A.; CARRARO, E.; KAMIKAWA, J.; LEAL, E.; GRANATO, C.; BELLEI, N. Rhinovirus species and their clinical presentation among

different risk groups of non-hospitalized patients. **J Med Virol**, v. 82, n. 12, p. 2110-5, 2010.

WHO - World Health Organization 2005. [Database on the internet]. Pocket book of hospital care for children. Guidelines for the management of common illnesses with limited resources. Available from: www.who.int/child_adolescent_health/documents/9241546700/en/.

WINTHER, B.; GWALTNEY, J. M., JR.; MYGIND, N.; TURNER, R. B.; HENDLEY, J. O. Sites of rhinovirus recovery after point inoculation of the upper airway. **Jama**, v. 256, n. 13, p. 1763-7, 1986.

WISDOM, A.; KUTKOWSKA, A. E.; MCWILLIAM LEITCH, E. C.; GAUNT, E.; TEMPLETON, K.; HARVALA, H.; SIMMONDS, P. Genetics, recombination and clinical features of human rhinovirus species C (HRV-C) infections; interactions of HRV-C with other respiratory viruses. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8518, 2009.

WOS, M.; SANAK, M.; SOJA, J.; OLECHNOWICZ, H.; BUSSE, W. W.; SZCZEKLIK, A. The presence of rhinovirus in lower airways of patients with bronchial asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 177, n. 10, p. 1082-9, 2008.

XIANG, Z.; GONZALEZ, R.; XIE, Z.; XIAO, Y.; LIU, J.; CHEN, L.; LIU, C.; ZHANG, J.; REN, L.; VERNET, G.; PARANHOS-BACCALA, G.; SHEN, K.; JIN, Q.; WANG, J. Human rhinovirus C infections mirror those of human rhinovirus A in children with community-acquired pneumonia. **J Clin Virol**, v. 49, n. 2, p. 94-9, 2010.

8. ANEXOS

ANEXO I FICHA CLÍNICA – PROJETO VÍRUS RESPIRATÓRIOS

Prontuário: _____

Local atendimento: _____ Data: ____/____/____

Data nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Gênero: M F

Duração da gestação: _____ semanas (definir: pré-termo ou termo) Cor: _____

Aleitamento materno: não sim (duração: _____)

Pais fumantes: não sim Pais atópicos: não sim

Doença de base presente (descrever qual patologia apresenta)

Cardiopatía: não sim

Displasia broncopulmonar: não sim

Imunodeficiência: não sim

Outras (definir): não sim

Descrição do quadro clínico

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| ▪ Início dos sintomas: _____ dias | ▪ Dor de garganta: não sim |
| ▪ Febre: _____ dias | ▪ Dor no corpo: não sim |
| ▪ Coriza: _____ dias | ▪ Mal estar: não sim |
| ▪ Tosse: _____ dias | ▪ Secreção ocular: não sim |
| ▪ Espirros: _____ dias | ▪ Hiperemia ocular: não sim |
| ▪ Outros: _____ | |

Frequência respiratória: _____ irpm

Murmúrio vesicular: _____ Chiados (sibilos): não sim

Retrações torácicas (tiragens): não sim

Apnéia ao atendimento (maior 20 seg com cianose ou bradicardia): não sim

Medicação em uso: _____

Rx de tórax: Hiperinsuflação não sim

Consolidação não sim

Atelectasia não sim

Gasometria arterial:	pH=	PaCO ₂ =	PaO ₂ =
	HCO ₃ =	SatO ₂ =	BE=

DIAGNÓSTICO NOSOLÓGICO: _____

Admissão: ____/____/____ Local: _____ Ventilação artificial: não sim (____ dias)

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Investigação de co-infecção viral em amostras positivas para rinovírus obtidas de crianças com doença do trato respiratório inferior, de janeiro de 2001 a julho de 2011, em Uberlândia, MG

Srs. Pais/Responsáveis,

O seu filho está sendo convidado para participar da pesquisa de vírus respiratórios em espécimes clínicos obtidos de crianças de 0-5 anos de idade com doença respiratória aguda, sob responsabilidade dos professores pesquisadores Dr. Jonny Yokosawa, Dra. Divina A. O. Queiróz e Dr. Hélio Lopes da Silveira e colaboração de Thelma F.M. Oliveira, Lourenço F. Costa, Guilherme R.O. e Freitas, Nayhanne T. de Paula, Bruno Moreira Carneiro, Tatiany Calegari, Poliana C. de Resende e Cecília F Quirino.

Os vírus respiratórios são os principais agentes causadores de doença respiratória aguda em crianças. Sendo assim, a detecção do agente que pode estar causando a infecção em seu filho, além de auxiliar o médico a tratá-lo, irá fornecer informações para trabalhos sobre mecanismos de infecção e sobre a circulação dos principais vírus respiratórios em nossa região. Para isso, precisamos colher aproximadamente 1mL de secreção de nasofaringe, através da instilação de soro fisiológico na narina da criança.

Essa amostra será coletada pelas enfermeiras Tatiany ou Poliana, também responsáveis pela aplicação do T.C.L.E., utilizando equipamento estéril para não haver risco para a criança, e serão processadas no Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o diagnóstico viral, a ser realizado pela equipe acima referida.

O preenchimento da ficha clínica será realizado pelo pediatra mediante informações obtidas dos pais ou responsáveis pela criança e da avaliação clínica. Todos os dados serão confidenciais e os resultados da pesquisa serão publicados sem a identificação do paciente. A participação na pesquisa é voluntária, sem qualquer ônus ou benefício para a criança, podendo ser encerrada a qualquer momento.

Os benefícios serão relativos à descoberta do agente causador da doença, que auxiliará o médico no tratamento e também para a obtenção conhecimento científico.

O paciente pode sofrer relativo desconforto quando da coleta de material clínico (instilação do soro fisiológico nas narinas). Entretanto, todo material utilizado será estéril e procedido por profissionais treinados e capacitados (enfermeiros e médicos).

A qualquer momento os pais e/ou responsáveis pela criança poderão se desligar da pesquisa, sem que haja qualquer tipo de prejuízo ou retaliação para a criança ou responsáveis pela mesma.

Uma cópia deste termo ficara em poder dos pais e/ou responsáveis pela criança.

Em caso de dúvida a respeito da pesquisa, entre em contato com qualquer um dos membros da equipe do Laboratório de Virologia acima referidos.

Instituto de Ciências Biomédicas – Laboratório de Virologia

Endereço: Av. Amazonas, Bloco 4C, andar superior; C.Umuarama; Uberlândia, MG

Fone: (034) 3218-2664

Uberlândia: ____/____/____

Nome do pai/mãe ou responsável

Assinatura

Enfermeira responsável pela coleta

Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Comitê de Ética em Pesquisa da UFU - (34) 3239-4531