

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

POLIANA CASTRO DE RESENDE BONATI

**VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM CRIANÇAS ATENDIDAS EM SERVIÇOS PÚBLICOS
DE ATENÇÃO PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA À SAÚDE DE UBERLÂNDIA, MG.**

UBERLÂNDIA
2010

POLIANA CASTRO DE RESENDE BONATI

**VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM CRIANÇAS ATENDIDAS EM SERVIÇOS PÚBLICOS
DE ATENÇÃO PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA À SAÚDE DE UBERLÂNDIA, MG.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Martins da Silva
Co-orientadora: Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz

UBERLÂNDIA
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- B699v Bonati, Poliana Castro de Resende, 1981-
Vírus respiratórios em crianças atendidas em serviços públicos de atenção primária e secundária à saúde de Uberlândia, MG [manuscrito] / Poliana Castro de Resende Bonati. - 2010.
61 f.
- Orientador: Carlos Henrique Martins da Silva.
Co-orientadora: Divina Aparecida Oliveira Queiroz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.
1. Doenças respiratórias infantis - Teses. 2. Vírus sinciciais respiratórios - Teses. I. Silva, Carlos Henrique Martins da. II. Queiroz, Divina Aparecida Oliveira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 616.2-053.2

POLIANA CASTRO DE RESENDE BONATI

**VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM CRIANÇAS ATENDIDAS EM SERVIÇOS PÚBLICOS
DE ATENÇÃO PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA À SAÚDE DE UBERLÂNDIA, MG.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carlos Henrique Martins da Silva (UFU)

Profa. Dra. Janaína Valadares Guimarães (UFG)

Prof. Dr. Jonny Yokosawa (UFU)

Prof. Dr. Orlando Cesar Mantese (UFU)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me concedeu a vida e sabedoria para realização deste trabalho.

Aos meus pais Irani (*in memoriam*) e Helena pelo exemplo, minha irmã, Adriana e ao meu esposo, Elsio Júnior, pelo incentivo nos momentos difíceis.

A professora Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz, por ter acreditado e contribuído para minha formação.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e orientador Prof. Dr. Carlos Henrique Martins da Silva que tornou possível a conclusão desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Virologia por contribuírem para a realização deste trabalho.

Aos pais das crianças que permitiram a participação dos seus filhos na pesquisa.

A coordenação da Atenção Primária à Saúde do Município de Uberlândia, Dra. Ana Abdalla, Leila Maria, Cláudia Pacheco e Ana Rita de Faria pela compreensão da importância desta pesquisa para meu aprimoramento profissional.

As enfermeiras, Lorena Afonso Borges e Clécia Azambuja de Paula, da Clínica Infantil Dom Bosco.

A equipe de funcionários da UBSF- Granada 1, UAI- Pampulha e Clínica Infantil Dom Bosco.

Aos membros da banca, Dr. Orlando César Mantese, Dra Valéria Boneti, Dr. Jonny Yokosawa e Dra Janaína Valadares Guimarães.

“O que é que se encontra no início? O jardim ou o jardineiro? É o jardineiro. Havendo um jardineiro, mais cedo ou mais tarde um jardim aparecerá. Mas, havendo um jardim sem jardineiro, mais cedo ou mais tarde ele desaparecerá. O que é um jardineiro? Uma pessoa cujo pensamento está cheio de jardins. O que faz um jardim são os pensamentos do jardineiro.”

Rubem Alves, 2002

RESUMO

No Brasil, os poucos estudos conduzidos com o objetivo de verificar a etiologia viral das doenças respiratórias agudas utilizaram, em geral, métodos tradicionais (imunofluorescência e cultura viral) em crianças hospitalizadas. O objetivo geral do presente estudo foi investigar a presença de vírus respiratórios por meio das técnicas de imunofluorescência indireta e da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em aspirados de nasofaringe de crianças com doença respiratória aguda atendidas em serviços públicos de atenção primária e secundária na cidade de Uberlândia, MG. Entre fevereiro de 2008 a maio de 2010 foram obtidos, por meio de uma amostra de conveniência, aspirados de nasofaringe de crianças menores de cinco anos com sintomas de doença respiratória aguda, atendidas na Unidade Básica de Saúde da Família - Granada 1, Unidade de Atendimento Integrado-Pampulha e Clínica Infantil Dom Bosco Uberlândia. Doença respiratória aguda foi definida pela presença de coriza, tosse, dificuldade para respirar ou sibilância, com ou sem febre. A imunofluorescência e a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase foram utilizadas para testar a presença de vírus respiratórios. Participaram do estudo 43 crianças (53,5% do gênero masculino e 46,5% gênero feminino) com idade entre dois a 60 meses (média = 18,3 meses; mediana = 15 meses; DP=±16). O diagnóstico clínico à admissão foi de resfriado comum em 23 crianças (53,4%), traqueobronquite, em quatro (9,3%), pneumonia, em doze (28%) e bronquiolite, em quatro (9,3%). Pelo menos um vírus respiratório foi detectado em 22 (51,1%) amostras, sendo que 26 vírus foram identificados. Dez (38,4%) amostras foram positivas para o vírus respiratório sincicial, dez (38,4%) para o rinovírus, três (11,5%) para o parainfluenzavírus; duas (7,7%) para adenovírus e uma (3,8%), para o influenzavírus. A presença de co-infecção ocorreu em três amostras. A imunofluorescência identificou nove (21%) e a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase dezenove (44,1%) vírus respiratórios. O rinovírus e o vírus respiratório sincicial foram os vírus mais prevalentes em crianças com doença respiratória aguda em serviços de atenção primária e secundária. A utilização de método molecular permitiu dobrar a capacidade de detecção de agente viral nos aspirados de nasofaringe.

Palavras-chave: vírus respiratórios, doenças respiratórias, imunofluorescência indireta, transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase, crianças.

ABSTRACT

In Brazil, the few studies conducted have used viral etiology, in general, traditional methods (immunofluorescence techniques and viral cultures) in hospitalized children. The purpose of the present study was to investigate the presence of respiratory viruses using indirect immunofluorescence techniques and the reverse transcription followed by polymerase chain reaction in nasopharyngeal aspirates of children with acute respiratory disease attendet in public institutions of primary and secondary care in the city of Uberlândia. Between february, 2008 to may, 2010 were obtained a convenience sample, nasopharyngeal aspirates from children under five years old with symptoms of acute respiratory disease, attended at Unidade Básica de Saúde da Família - Granada 1, Unidade de Atendimento Integrado-Pampulha and in Clinica Infantil Don Bosco in Uberlândia. Acute respiratory disease was defined by the presence of coryza, coughing, breathing difficulties and/or sibilance, with or without fever. The indirect immunofluorescence techniques and the reverse transcription followed by polymerase chain reaction were used to test for the presence of respiratory viruses. A total of 43 children (53,5% male and 46,5% female) between two and 60 months of age (average: 18,3 months; median 15 months; DP±16). The clinical diagnosis for admission was common cold for 23 children (53,4%), tracheobronchitis in four (9,3%); pneumonia in 12 (28%) and bronchiolitis in four (9,3%). At least one respiratory virus was detected in 22 (51,1%) of the samples. A total of 26 viruses were identified. Ten (38,4%) samples were positive for the respiratory syncytial virus; ten (38,4%) for rhinovirus, three (11,5%) for parainfluenzavirus; two (7,7%) for adenovirus and one (3,8%) for influenzavirus. Co-infection occurred in three of the samples. The indirect immunofluorescence techniques identified nine (21,0%) and the reverse transcription followed by polymerase chain reaction 19 (44,1%) of the respiratory viruses. The rhinovirus and respiratory syncytial virus were the respiratory virus most prevalent in children with acute respiratory disease in public institutions of primary and secondary care. The use of molecular method permitted a two fold increase in the capacity for detection of the viral agent collected from the nasopharyngeal aspirates.

Key words: respiratory viruses, respiratory disease, imunofluorescence techniques, reverse transcription-polymerase chain reation, children

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdV – Adenovírus

ANF – Aspirado de nasofaringe

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

DRA – Doença respiratória aguda

DTRS – Doença do trato respiratório superior

DTRI – Doença do trato respiratório inferior

FLU – Influenzavírus

HBov – Bocavírus humano

hCov – Coronavírus humano

Hib – Haemophilus influenzae tipo b

hMPV – Metapneumovírus

HRV – Rinovírus

IFI – Imunofluorescência indireta

IRA – Infecção respiratória aguda

IVAS – Infecção das vias aéreas superiores

OMA – Otite média auda

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PIV – Parainfluenzavírus

RNA – Ácido ribonucléico

RT-PCR– Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase

UAI – Unidade de Atendimento Interado

UBSF – Unidade Básica de Saúde da Família

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

VRS – Vírus respiratório sincicial

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Modelo representativo do vírus respiratório sincicial	18
Figura 2	Modelo representativo do rinovírus	19
Figura 3	Modelo representativo do parainfluenzavírus	20
Figura 4	Modelo representativo do adenovírus	22
Figura 5	Modelo representativo do influenzavírus	23
Figura 6	Distribuição sazonal dos vírus detectados nos aspirados de nasofaringe de crianças atendidas na atenção primária e secundária à saúde no período de 2008-2010, em Uberlândia, MG	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas e clínicas de crianças atendidas na atenção primária e secundária à saúde no período de 2008-2010, em Uberlândia, MG	34
Tabela 2	Vírus respiratórios identificados nas crianças atendidas na UBSF-Granada, UAI-Pampulha e Clínica Infantil Dom Bosco no período de 2008 -2010 em Uberlândia, MG	34
Tabela 3	Desempenho dos métodos diagnósticos na detecção de vírus nas amostras de aspirado de nasofaringe de crianças atendidas na atenção primária e secundária à saúde no período de 2008-2010, em Uberlândia, MG	35
Tabela 4	Distribuição dos vírus respiratórios segundo a faixa etária de crianças atendidas na atenção primária e secundária à saúde no período de 2008-2010, em Uberlândia, MG	35
Tabela 5	Distribuição de vírus respiratórios identificados segundo o diagnóstico clínico de crianças atendidas na atenção primária e secundária à saúde no período de 2008-2010, em Uberlândia, MG	36
Tabela 6	Distribuição de vírus respiratórios detectados nas amostras de nasofaringe de crianças atendidas na atenção primária e secundária à saúde no período de 2008-2010, em Uberlândia, MG	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Infecções Respiratórias Agudas	14
1.1.1	Resfriado Comum	14
1.1.2	Laringotraqueobronquite	15
1.1.3	Bronquiolite	15
1.1.4	Pneumonia	17
1.2	Vírus Respiratórios	18
1.2.1	Vírus Respiratório Sincicial	18
1.2.2	Rinovírus	19
1.2.3	Parainfluenzavírus	20
1.2.4	Adenovírus	21
1.2.5	Influenzavírus	22
1.3	Outros vírus	23
1.3.1	Metapneumovírus	24
1.3.2	Coronavírus	24
1.3.3	Bocavírus	25
1.4	Diagnóstico Laboratorial	25
2	OBJETIVOS	28
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
3.1	Coleta do aspirado de nasofaringe	30
3.2	Espécime Clínico	30
3.2.1	Extração de ácido nucléico do tipo RNA dos ANF	31
3.3	Análise Estatística	31
4	RESULTADOS	32
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	58
	ANEXO A – Parecer ético CEP nº 390/08	59
	ANEXO B – Ficha clínica	60
	ANEXO C – Tabela geral de amostras	61

1 INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias agudas (IRA) continuam a ser a principal causa de morbidade e mortalidade infantil em todo o mundo e resultam em cerca de dois milhões de mortes a cada ano (WHO, 2004) (KIENY et al., 2005). Entre os principais agentes etiológicos responsáveis por essas infecções incluem o vírus respiratório sincicial (VRS), o rinovírus (HRV), o vírus do sarampo, os parainfluenzavírus tipo 1, 2 e 3 (PIV-1, PIV-2 e PIV-3), o vírus da gripe, o vírus da varicela, o *Streptococcus pneumoniae*, o *Haemophilus influenzae*, o *Staphylococcus aureus* e outras bactérias (WHO, 2009).

Os vírus respiratórios têm sido agentes relacionados a quadros respiratórios que variam desde o resfriado comum até pneumonias graves (OLIVEIRA et al., 2004) e acarretam em altos índices de hospitalizações (COUNIHAN et al., 2001).

Infecções respiratórias graves acometem, com maior frequência, idosos (THOMPSON et al., 2003) e crianças (SHEK; LEE, 2003; TSUCHIYA et al., 2005), constituindo um risco mais elevado para aquelas que são recém nascidos pré-termo, que possuem distúrbios cardíacos, pulmonares ou do sistema imune.

Vale lembrar que lactentes e pré-escolares podem evoluir mais rapidamente com desconforto respiratório ou insuficiência respiratória que crianças maiores e adolescentes, pois apresentam vias aéreas com menor calibre, maior demanda metabólica, diminuição das reservas ventilatórias e mecanismos compensatórios inadequados.

A principal causa viral de doença respiratória grave em crianças é o VRS, principal agente da bronquiolite infantil, associado a significativos índices de morbidade e mortalidade, seguido do vírus parainfluenza (PIV -1, PIV -2 e PIV -3), especialmente o PIV -3. Todas as crianças até a idade de dois anos têm pelo menos um episódio de infecção pelo PIV e / ou VRS (KARRON et al., 2008).

Embora a incidência de doenças devido a esses patógenos não está estabelecida com precisão nos países em desenvolvimento, os dados conhecidos nos países industrializados, como a notificação de 125 mil casos de infecções por VRS por ano nos Estados Unidos (SHAY et al., 1999), levam a estimativa impressionante de um total de 64 milhões de casos e 160.000 mortes por ano de infecção por esse vírus em todo o mundo. Vale ressaltar que o VRS foi identificado em 15% a 40 % dos casos de bronquiolite ou pneumonia em pacientes hospitalizados nos países em desenvolvimento (WEBER et al., 1998; SHAY et al., 1999; SANGARÉ et al., 2006).

1.1 Infecções Respiratórias Agudas

As IRA abrangem amplo espectro de manifestações clínicas como coriza, dor de garganta, otalgia, tosse e dificuldade para respirar que se relacionam com os diagnósticos de resfriado comum, laringotraqueobronquite, bronquite, bronquiolite e pneumonia (FAÇANHA et al., 2004).

1.1.1 Resfriado Comum

O resfriado comum é uma doença viral aguda e autolimitada do trato respiratório superior. É a doença mais freqüente que acomete os humanos. Lactentes e pré-escolares podem ter três a oito episódios anuais. Em crianças é comum a presença de febre (em geral por três dias) e sintomas nasais (coriza, obstrução nasal, espirros) por vezes associados à tosse, dor de garganta, otalgia, perda do apetite e irritabilidade. Esses sintomas podem persistir por até duas semanas (CHERRY, 1987 apud HERNANDEZ, 1998) e ocorrem, conforme a etiologia viral, predominantemente no inverno (nos países de clima temperado) (REED et al., 1981) e nos meses chuvosos (nos países tropicais) (FOX et al., 1985 apud HERNANDEZ, 1998). O período de maior excreção viral ocorre principalmente entre o terceiro e quinto dia da doença (GWALTNEY, 1982, 2002 apud HERNANDEZ, 1998).

Vários vírus são relacionados como causadores dos sintomas do resfriado comum como o HRV, o VRS, vírus influenza (FLU), o PIV, o adenovirus (AdV), enterovirus, coranovirus e metapneumovirus (TYRRELL, 1990 apud HERNANDEZ, 1998). Os HRV são responsáveis por mais da metade dos episódios de resfriado comum em crianças e em adultos.

O HRV replica-se nas vias respiratórias superiores, principalmente no nariz, já que das secreções nasais recuperaram-se grandes quantidades de vírus e muito poucas das secreções faríngeas. Além disso, o rinovírus pode ser detectado na pele do rosto e das mãos, como resultado de contaminação com as secreções respiratórias, bem como de objetos domiciliares (HENDLEY, 1988 apud HERNANDEZ, 1998).

Apenas uma pequena porcentagem de crianças apresenta complicações do resfriado comum como otite média ou sinusite (CHERRY, 1987 apud HERNANDEZ, 1998). No entanto, a prescrição de antibióticos para crianças com resfriado comum não complicado ainda é freqüente (GWALTNEY, 1982 apud HERNANDEZ, 1998).

1.1.2 Laringotraqueobronquite

A laringotraqueobronquite (ou crupe) refere-se a uma série de doenças respiratórias que são caracterizadas por diferentes graus de estridor inspiratório, tosse, rouquidão e dificuldade respiratória resultante da obstrução das vias aéreas superiores. Atinge principalmente crianças com idade entre seis meses e três anos de idade, a incidência no sexo masculino é de aproximadamente uma vez e meia maior do que no feminino (CHERRY et al., 2008). Os sintomas são geralmente de curta duração com melhora da tosse em 48 horas em cerca de 60% dos casos, mas podem persistir por até uma semana (BJORNSEN et al., 2008).

Os vírus parainfluenza dos tipos 1 e 3 são os principais agentes etiológicos da laringotraqueobronquite (MARX et al., 1997). No entanto, os vírus influenza (A e B), adenovírus, VRS, metapneumovírus e coronavírus são também detectados nesta doença (DENNY et al., 1983; CHAPMAN et al., 1981; VAN DER HOEK et al., 2006; WILLIAMS et al., 2004 apud BJORNSEN et al., 2008). É provável que o número crescente de vírus associado com sintomas relacionados com laringotraqueobronquite seja um reflexo da utilização de novas técnicas moleculares de detecção viral. Entretanto, o diagnóstico é clínico e os testes de detecção de antígenos virais bem como a cultura viral raramente são necessárias para o manejo da doença (BJORNSEN et al., 2008).

1.1.3 Bronquiolite

A bronquiolite é uma doença viral aguda, causada comumente pelo VRS, caracterizada por inflamação, edema e necrose das células epiteliais das vias aéreas de pequeno calibre que resultam em aumento da produção de muco e, do ponto de vista clínico, em sibilância e crepitações à ausculta pulmonar (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2006).

O diagnóstico da bronquiolite é clínico e de exclusão. Em geral, considera-se bronquiolite o primeiro episódio de sibilância em crianças menores de dois anos de idade com sintomas de doença respiratória viral aguda que não se identifica outro diagnóstico como pneumonia ou atopia (OCHOA SANGRADOR, 2010). Além da sibilância, outras manifestações clínicas podem ocorrer como recusa alimentar, irritabilidade, tosse, taquipnéia, desconforto respiratório (batimento de aletas nasais e retrações intercostais /

subcostais) e apnéia (OCHOA SANGRADOR, 2010). As alterações radiológicas (hiperinsuflação e espessamento peri-brônquico) embora inespecíficas podem ser de auxílio no diagnóstico diferencial (WOHL, 1990).

No entanto, existe uma significativa heterogeneidade entre os critérios diagnósticos da bronquiolite. Por exemplo, aqueles utilizados na América do Norte exigem como principal sinal a presença de sibilos expiratórios e no Reino Unido, crepitações (OCHOA SANGRADOR, 2010).

Os critérios tradicionais amplamente aceitos são os propostos por MCCONNCHIE, (1983) que considera bronquiolite como "o primeiro episódio de desconforto respiratório agudo com sibilância precedido por quadro de infecção das vias aéreas superiores (rinite, tosse, com ou sem febre) em crianças menores de dois anos de idade, mas principalmente antes do primeiro ano da vida".

Várias condições clínicas devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da bronquiolite: asma, pneumonia, doença pulmonar crônica, inalação de um corpo estranho, fibrose cística, cardiopatias congênitas, sepse e acidose metabólica. No entanto, a principal dificuldade reside na diferenciação entre bronquiolite e sibilância recorrente resultante de predisposição atópica em resposta a diferentes desencadeantes ambientais ou infecciosos. A inclusão nos critérios diagnósticos do limite de faixa etária (menores de dois anos de idade) pode ser útil nessa diferenciação (OCHOA SANGRADOR, 2010).

Infelizmente, a informação sobre a validade e precisão dos diferentes sinais e sintomas da bronquiolite é tratada exclusivamente em estudos descritivos e, especialmente, a partir da opinião de especialistas (SIGN, 2006). Portanto, é esperado que os aspectos clínicos de pacientes classificados como bronquiolite em vários trabalhos podem ser tão heterogêneos.

A identificação do VRS em secreções das vias respiratórias de crianças com sibilância não afasta outros diagnósticos (SANTANNA; DELI, 1998). Sinais e sintomas da bronquiolite não são absolutamente distintos conforme o agente viral causador. O VRS seguido do HRV são os principais agentes etiológicos da bronquiolite. No entanto, outras causas incluem o PIV, o FLU, o AdV, o metapneumovirus, o coronavírus e o bocavirus humano (PITREZ et al., 2005). Episódios de sibilância em lactentes têm sido relacionados a infecções pelo *Mycoplasma pneumoniae* (FISCHER; MENDONÇA, 1991).

O curso clínico da bronquiolite é em geral benigno e autolimitado. Os sintomas persistem por três a sete dias e são controlados apenas com medidas gerais (sintomáticos).

Apenas uma pequena percentagem de pacientes necessitará de internação hospitalar, geralmente para receber oxigênio suplementar ou hidratação (SANTANNA; DELI, 1998). Crianças mais jovens e aquelas com fatores de risco (prematuridade, cardiopatia congênita, doença pulmonar crônica ou displasia broncopulmonar) são mais propensas a evoluir com doenças graves e com necessidade de hospitalização (OCHOA SANGRADOR, 2010).

1.1.4 Pneumonia

Definida como infecção do parênquima pulmonar, é causada pela agressão de microorganismos (vírus, bactérias, agentes atípicos e fungos) que geralmente colonizam a mucosa da nasofaringe e se dissemina para as vias aéreas inferiores (FIGUEIREDO, 2009). Reconhece-se que os vírus são responsáveis por 40% das pneumonias adquiridas na comunidade e que necessitam hospitalização, particularmente em crianças com idade menores de dois anos de idade. Os vírus, ao lesarem a mucosa do trato respiratório, prejudicam seus mecanismos locais de defesa, favorecendo assim o surgimento de pneumonias bacterianas secundárias (FIGUEIREDO, 2009).

O diagnóstico de pneumonia viral é baseado em achados clínicos (febre, dificuldade de respirar, taquipnéia e sibilância) e/ou radiológicos (infiltrado intersticial). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o diagnóstico de pneumonia deve ser suscitado em toda criança com tosse ou dificuldade em respirar associada à taquipnéia definida como frequência respiratória acima de 60, 50 e 40 para crianças com idade entre duas semanas a dois meses, dois meses a doze meses e doze meses a cinco anos, respectivamente (RANGANATHAN; SONNAPPA, 2009).

Dado que os sinais e sintomas da pneumonia em lactentes são frequentemente pouco distinguíveis da bronquiolite, o termo infecções respiratórias inferiores tem sido preferencialmente utilizado, em especial em estudos epidemiológicos. O VRS e o FLU são os principais causadores das pneumonias virais seguidos do HRV, PIV, AdV e metapneumovirus (NOLTE, 2008).

Nos últimos anos, os coronavírus, os vírus influenza A tipo H5N1 (da gripe aviária) e os hantavírus ganharam notoriedade como causadores de pneumonias graves (insuficiência respiratória e alta letalidade) (NOLTE, 2008).

A pneumonia em sua maioria causada ou precipitada por vírus ainda é responsável por cerca de 21% das mortes em crianças com idade inferior a cinco anos. Estima-se que

de cada mil crianças nascidas vivas entre doze a vinte morrem de pneumonia antes do quinto ano de vida (WHO, 2009).

1.2 Vírus respiratórios

Dentre os vírus respiratórios, o vírus respiratório sincicial (VRS), os rinovírus (HRV), os parainfluenzavírus (PIV), os adenovírus (AdV), os influenzavírus (FLU) e o metapneumovírus (hMPV) são os principais responsáveis pelas infecções respiratórias agudas (MOSCONA, 2005), tanto do trato respiratório superior (TRS) como do inferior (TRI) (ECHEVARRIA et al., 1998; CROWE; WILLIAMS, 2002).

1.2.1 Vírus Respiratório Sincicial

O VRS assim denominado por produzir sincícios em cultura de células foi isolado em 1956 e inicialmente identificado como um patógeno de coriza em chimpanzés é um membro da família *Paramyxoviridae*, gênero *Pneumovirus*. É um vírus envelopado do tipo RNA de fita simples e com polaridade negativa. Seu genoma codifica para onze proteínas: quatro proteínas do nucleocapsídeo (N, P, L e M 2-1); três glicoproteínas do envelope (G, F e SH); duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2); uma matriz (M) e um fator regulatório de RNA (M 2-2) (WHITEHEAD et al., 1999). A Figura 1 mostra um modelo representativo do vírus.

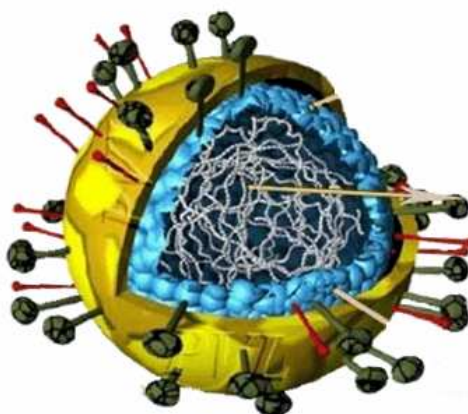


Figura 1. Modelo representativo do vírus respiratório sincicial

FONTE: www.tulane.edu/dmsander/Big_Virology/BVHomePage.HTML

Estima-se que o VRS seja responsável por 20% a 30% das IRA em crianças menores de cinco anos de idade na Colômbia, Tailândia e Brasil. É o principal agente causador das doenças graves do trato respiratório em crianças, especialmente as bronquiolites (STRALIOTTO et al., 2002; COSTA et al., 2006).

Entretanto, o espectro de doenças relacionadas com o VRS compreende além das bronquiolites, rinites, otites e pneumonias. Considera-se que virtualmente todas as crianças são infectadas por este vírus até os dois anos de idade e aquelas com idade inferior a seis meses as mais susceptíveis a infecções graves (QUEIROZ et al., 2002; ABERLE et al., 2005; SOMECH et al., 2006).

A epidemia de VRS apresenta uma sazonalidade bem clara, ocorrendo anualmente no período de outono tardio, inverno (NASCIMENTO et al., 1991; MOURA et al., 2003; TOMAZELLI et al., 2007).

A transmissão ocorre por via ocular e nasal por contato com secreções ou, mais freqüentemente, por meio de objetos contaminados. A infecção ocorre no epitélio respiratório e o período de incubação viral varia de dois a oito dias (HEIN, 2003).

1.2.2 Rinovírus

Os rinovírus (HRV) principais representantes da família *Picornaviridae* são vírus não envelopados com genoma de RNA de fita simples com polaridade positiva. O capsídeo icosaédrico (Figura 2) é formado por 60 protômeros, cada um deles constituído por quatro proteínas virais (VP1- VP4). Agrupamentos VP1, VP2 e VP3 formam a parte externa de cada protômero enquanto VP4 está localizada mais internamente (ROSSMAN, 1985).

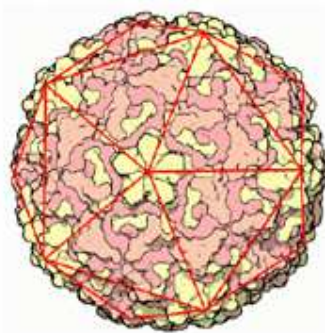


Figura 2. Modelo representativo do rinovírus

FONTE: www.tulane.edu/dmsander/Big_Virology/BVHomePage.HTML

É o mais freqüente agente etiológico relacionado com doenças envolvendo as vias respiratórias superiores em crianças (ARRUDA et al., 1991; PITKARANTA et al., 1998; COSTA et al., 2006). Por outro lado, esses vírus são associados ao agravamento de asma, bronquite crônica e também bronquiolite aguda em crianças de tenra idade que apresentam doenças de base e otites (ARRUDA; HAYDEN, 1993; PITKARANTA et al., 1998; ANDREOLETTI et al., 2000; PITREZ et al., 2005; COSTA et al., 2006). De acordo com KOTANIEMI-SIRJANEN et al. (2003) o rinovírus também está associado a hospitalizações de crianças com sibilância.

Os sintomas de resfriado comumente relacionados com o rinovírus não são devidos a destruição tecidual e sim pela ação de mediadores inflamatórios que resultam em vasodilatação, edema tecidual, transudação de proteínas plasmáticas, secreção glandular e provavelmente sensibilização dos reflexos neurais responsáveis pela congestão nasal, rinorréia, espirro e dor de garganta (GWALTNEY; HANINZ, 2002). Durante a infecção o HRV pode ser detectado em secreções nasais de oito a dezoito horas após inoculação experimental e os sintomas surgem precocemente por volta de dez a doze horas. A excreção viral atinge pico em cerca de 48 horas, mas pode durar até três semanas (GWALTNEY; HANINZ, 2002).

1.2.3 Parainfluenzavírus

O vírus parainfluenza (PIV) pertencente à família *Paramyxoviridae*, gênero *paramyxovirinae* é composto por genoma de RNA de fita simples de polaridade negativa. Distingue-se dos outros vírus da família por seu envelope glicoprotéico com atividade hemaglutinante e neuraminidase (Figura 3). Pode ser classificado em tipos 1 a 4. O tipo 4 é composto de dois subtipos, A e B (HENRICKSON, 2003).

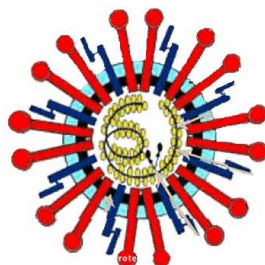


Figura 3. Modelo representativo do parainfluenzavírus

FONTE: LAMB;KOLAKOFSKY, 1996

Todos os tipos compartilham antígenos comuns e vêm sofrendo variações antigênicas ao longo dos anos que os tornam diferentes das cepas iniciais (HENRICKSON, 2003).

A transmissão ocorre via trato respiratório superior com infecção da mucosa nasal e da nasofaringe. O processo inflamatório se estende por todo trato respiratório, particularmente nos tecidos subglóticos, podendo ocorrer acúmulo de muco resultando em pneumonia. O período de incubação é de três a quatro dias e a excreção viral ocorre de quatro a sete dias em média, podendo ser mais prolongada para o PIV-3 (HENRICKSON, 2003).

O vírus parainfluenza causa um espectro de doenças respiratórias tanto de vias superiores como inferiores. A maioria das crianças são infectadas pelo parainfluenzavírus tipo 3 (PIV-3) até a idade de dois anos e pelo parainfluenzavírus tipos 1 e 2 (PIV-1 e PIV-2) até a idade de cinco anos. O PIV-3 causa doença respiratória grave em crianças com idade inferior a 12 meses (WHO, 2009).

Como referido anteriormente a laringotraqueobronquite é causada em sua maioria pelo PIV-1 e PIV-3 e é a principal causa de internação de infecções em crianças com idade entre dois a seis anos de idade (WHO, 2009).

Surtos de infecções por este vírus ocorrem anualmente, especialmente na primavera e no verão. A distribuição sazonal das infecções causadas pelo vírus parainfluenza nos países em desenvolvimento ainda não está bem esclarecida (WHO, 2009).

1.2.4 Adenovírus

Os adenovírus (AdV) pertencem à família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovírus* e são vírus que não possui envelope. O capsídeo possui 252 subunidades chamadas capsômeros dispostos numa estrutura icosaédrica (Figura 4). O genoma viral é composto de DNA de fita-dupla, linear, não segmentado (SPENCER; CHERRY, 1987; BAUM, 1995).

O vírus é encontrado em todo o mundo e pode circular de forma esporádica, endêmica ou epidêmica no inverno, primavera e começo do verão. A infecção ocorre em todas as idades, mas a incidência é maior principalmente entre seis meses e cinco anos.

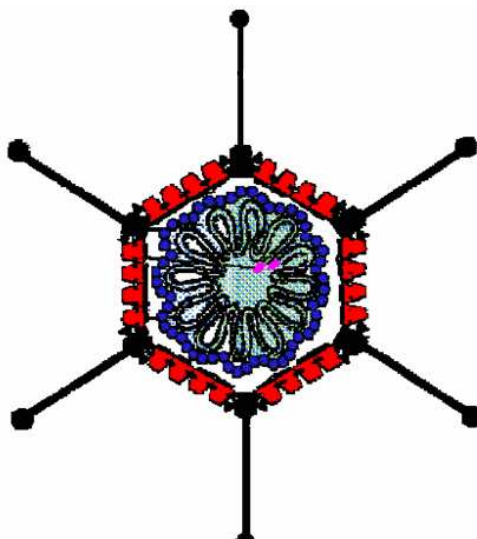


Figura 4. Modelo representativo do adenovírus

FONTE: DOERFLER, 1995

As infecções iniciais geralmente ocorrem no trato respiratório superior e envolve a mucosa nasal, orofaringe e conjuntiva. O período de incubação para doença respiratória por AdV é de quatro a cinco dias.

Os AdV causam quadros clínicos que incluem infecções respiratórias (nasofaringites, faringite, amigdalite, laringotraqueite, bronquiolite e pneumonia) e não respiratórias (febre faringoconjuntiva, ceratoconjuntivite, epidêmica, cistite hemorrágica, diarreia, intussuscepção intestinal e infecção do sistema nervoso central) (SPENCER; CHERRY, 1987; BAUM, 1995).

1.2.5 Influenzavírus

Outro agente viral com grande impacto em infecções respiratórias agudas são os influenzavírus, membros da família *Orthomyxoviridae*, gênero A, B e C. O genoma viral é composto de RNA de fita simples de polaridade negativa. É segmentado em oito (influenza A e B) ou sete (influenza C) partes. O envelope é coberto com espículas, partículas filamentosas esféricas ou alongadas (Figura 5) (SPENCER; CHERRY 1987).

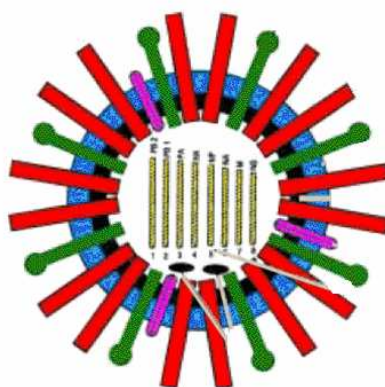


Figura 5. Modelo representativo do influenzavírus

FONTE: LAMB; KRUG, 1996

Epidemias e surtos de gripe ocorrem em diferentes padrões sazonais, dependendo da região do mundo: em zonas de clima temperado, as epidemias sazonais geralmente começam no final do outono e em meados do inverno, infectando cerca de 5% a 15% da população em cada temporada. Nas zonas tropicais, os padrões sazonais são menos evidentes o vírus pode ser isolado durante todo o ano (WHO, 2009).

A doença que se caracteriza pela presença de febre e sintomas respiratórios com graus variáveis de gravidade pode evoluir com pneumonia primária fulminante e letal, especialmente em pessoas com patologias pulmonares ou cardíacas subjacentes.

A ocorrência repetitiva de epidemias anuais de gripe é mantida através do processo contínuo de "drift antigênico", que resulta da acumulação de mutações nos genes que codificam as duas proteínas virais de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), e leva o surgimento constante de novas variantes do vírus contra os quais há pouca ou nenhuma imunidade pré-existente na população. Por esta razão, as grandes epidemias sazonais de gripe continuam a ocorrer todos os anos e as cepas de vírus a serem incluídos na vacina do ano devem ser escolhidas para coincidir com as variantes emergentes (FERGUSON et al., 2003).

1.3 Outros Vírus

Ao longo dos anos, o VRS e os FLU foram considerados os principais patógenos causadores de doenças agudas das vias aéreas respiratórias inferiores em crianças. No entanto, durante a última década e com a utilização de metodologias moleculares mais

sensíveis, novos vírus foram identificados e associados a estas infecções como o metapneumovírus humano, o coronavírus e o bocavírus, entre outros (ALBUQUERQUE et al., 2009).

1.3.1 Metapneumovírus

O metapneumovírus é um vírus respiratório de RNA de fita simples e polaridade negativa, recentemente descoberto, pertencente a família *Paramyxoviridae* e gênero *Metapneumovirus* (HOOGEN et al., 2001). Foi identificado pela primeira vez em 2001 em amostras de aspirado de nasofaringe de crianças com infecção respiratória aguda (HOOGEN et al., 2001).

Nos climas temperados a infecção pelo metapneumovírus apresenta picos de incidência no final do inverno e primavera, uma distribuição sazonal em muito semelhante à do VRS, o que favorece a co-infecção. No entanto, não há evidência de maior gravidade naqueles indivíduos com doença respiratória por co-infecção VRS/metapneumovírus. (MARGUET, 2009).

1.3.2 Coronavírus

Os coronavírus pertencem à família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus*. Possuem partículas pleomórficas de 80 a 150 nm com projeções superficiais em forma de pétala que lhes dão o aspecto de uma coroa. São vírus de RNA e todos se desenvolvem de forma exclusiva no citoplasma das células infectadas (FIGUEIREDO, 2009). Distintas cepas causam doenças com características semelhantes como o resfriado comum em crianças e adultos, mais frequentes no inverno e na primavera (HART; CUEVAS, 2007), época em que essas infecções podem representar 35% do total das infecções respiratórias virais das vias aéreas superiores (HART; CUEVAS, 2007). A reinfecção é comum, o período de incubação é mais prolongado e sua duração mais breve que o do RN, mas os sintomas são similares. Embora pouco frequente, há relatos de doença respiratória grave de vias aéreas inferiores associadas ao coronavírus que evolui com insuficiência respiratória (síndrome da angústia respiratória aguda) e com alta letalidade (DOMINGUES et al., 2009).

1.3.3 Bocavírus

O bocavírus humano foi recentemente identificado como causador de doença respiratória. Isolado em 2005 em amostras de secreções respiratórias de crianças suecas com infecções do trato respiratório inferior, tem sido detectado em vários países, estando associado à bronquiolite, episódios recorrentes de sibilância, crises de asma, infecção respiratória alta e pneumonia (GARCÍA-GARCIA et al., 2007).

A maioria das infecções pelo bocavírus ocorre entre seis meses e três anos de idade, e à semelhança dos outros vírus respiratórios, apresenta um padrão sazonal de distribuição dos casos ao longo do ano, com maior frequência durante os meses de inverno e primavera. O bocavírus tem sido identificado em 1,5% a 19% de crianças com infecção respiratória das vias aéreas inferiores (GARCÍA-GARCIA et al., 2007) (BOON HUAN et al., 2009). Por vezes, é considerado o terceiro agente viral mais frequentemente isolado em amostras do aspirado de nasofaringe de crianças hospitalizadas por infecções respiratórias (GARCÍA-GARCIA et al., 2007). Vale ressaltar a elevada frequência (18% e os 90%) de detecção simultânea do bocavírus com outros vírus respiratórios, que é significativamente maior que qualquer outra associação (co-infecção) entre outros vírus (ESPOSITO et al., 2008).

1.4 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico etiológico das doenças respiratórias virais é feito mediante técnicas de isolamento e de detecção de antígenos virais por métodos tradicionais (imunofluorescência ou ensaio imunoenzimático) ou moleculares.

O isolamento em culturas celulares é considerado o método de eleição ou padrão para diagnóstico virológico. Entretanto, é um método trabalhoso e relativamente lento. Encurtamento do tempo de obtenção de resultados e aumento da sensibilidade é obtido com centrifugação a baixa velocidade das culturas celulares inoculadas e identificação posterior por imunofluorescência (WEISSENBACKER; AVILA, 1998).

A técnica de imunofluorescência, tanto direta quanto indireta, é simples e permite a rápida identificação de vários vírus. O soro antivírus específico e o antígeno viral (produzido em animais) são marcados com fluoresceína no método direto e indireto, respectivamente (WEISSENBACKER; AVILA, 1998).

A OMS coordenou estudos multicêntricos para o desenvolvimento e a utilização de anticorpos monoclonais para o diagnóstico de doenças respiratórias virais agudas por meio da imunofluorescência que contou com a participação de dezesseis laboratórios diferentes (WHO, 1992). Atualmente é possível obter os anti-soros específicos, policlonais ou monoclonais, para a identificação da maioria dos vírus respiratórios. Está demonstrado que misturas de anticorpos monoclonais têm alta sensibilidade e especificidade para identificar antígenos virais em amostras clínicas, comparável a qualquer outro método de referência. Espera-se uma perda mínima de sensibilidade quando comparadas com misturas de anticorpos policlonais de alta qualidade, mas permitem leitura mais simples e de qualidade muito superior. (ANDREOLETTI et al., 2000).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite detectar quantidades muito pequenas de vírus mediante a amplificação de seqüências do ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico viral presente na amostra. O processo requer o uso de oligonucleotídeos complementares de seqüências genômicas conservadas do vírus denominados *primers* e de uma enzima DNA polimerase termoestável. Como resultados da reação, são obtidos milhões de cópias a partir de uma única seqüência do DNA viral que logo podem ser detectadas a olho nu (por meio do tingimento com brometo de etídio) ou por meio de hibridação (radioativa ou enzimática) (FREYMUTH et al., 2006).

Os métodos moleculares representam o novo “padrão” para o diagnóstico de infecções respiratórias virais, dada sua sensibilidade e especificidade ao redor de 100%, superior, portanto, às técnicas de cultura em tecido ou de detecção de agentes virais com anticorpos monoclonais (BHARAJ et al., 2009). Na comparação com cultura em tecidos, os métodos moleculares apresentam sensibilidade superior em até 30%. Além disso, alguns vírus respiratórios de grande relevância clínica só podem ser satisfatoriamente identificados através de métodos moleculares, como o rinovírus, o coronavírus e o metapneumovírus humano (HENRICKSON et al., 2004).

Atualmente *kits* comerciais de *multiplex* PCR são disponibilizados para a identificação de até sete vírus através da PCR ou PCR em tempo real, resultando num custo e trabalho significativamente menores que as reações de PCR independentes para cada um dos vírus respiratórios (WU; TANG, 2009). O método de PCR em tempo real, bastante interessante por minimizar o tempo de processamento e risco de contaminação, apresenta como grande desvantagem o alto custo dos reagentes e a impossibilidade de detectar mais de quatro agentes ao mesmo tempo (ERDMAN et al., 2002).

Outro método bastante promissor é a eletroforese automatizada em capilar que pode ser utilizada para a detecção de produtos de PCR ou *multiplex* PCR em um seqüenciador de DNA equipado com um *software* de análise de polimorfismo de fragmentos. A utilização de RT-PCR com eletroforese capilar analisada pelo *software* GeneScan® reduz o percentual de amostras negativas por cultura e/ou a imunofluorescência negativas de 69% para 22% (TOMAZELLI et al., 2007).

A grande vantagem do método de eletroforese capilar em seqüenciador automatizado é o diagnóstico de infecções respiratórias virais em larga escala, pois viabiliza a detecção de um grande número de vírus com redução de custos e mão de obra (BENGUIGUI, 1998).

A disponibilização destes métodos (imunofluorescência, ELISA e PCR) tem permitido o diagnóstico rápido (entre quatro a vinte e quatro horas) e acurado das infecções respiratórias virais e bacterianas e possibilitado o tratamento precoce com drogas antivirais quando indicadas (KUYPERS et al., 2006).

A maioria dos estudos que trata da prevalência de vírus causadores de doenças respiratórias agudas em crianças foi conduzida em ambiente hospitalar, ou seja, referente a infecções mais graves. Informação a respeito da circulação de determinados vírus respiratórios em serviços de atenção primária e secundária poderá contribuir para vigilância clínica epidemiológica, auxiliar o diagnóstico clínico mais acurado e reduzir o número de prescrições inadequadas baseadas em antibióticos para tratar doenças virais.

2 OBJETIVOS

Investigar a presença de vírus respiratórios por meio das técnicas de imunofluorescência indireta e da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em aspirados de nasofaringe de crianças com doença respiratória aguda atendidas em serviços públicos de atenção primária e secundária à saúde de Uberlândia, MG.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de prevalência realizado entre fevereiro de 2008 a maio de 2010 que por meio de uma amostra de conveniência foram obtidos aspirados de nasofaringe de crianças menores de cinco anos de idade atendidas em serviços de atenção primária (Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) - Bairro Granada I) e secundária (Unidade de Atendimento Integrado (UAI) – Pampulha e Clínica Infantil Dom Bosco) do município de Uberlândia, Minas Gerais, com sintomas de doença respiratória aguda, cujo início não tivesse ultrapassado cinco dias. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (Anexo A). Pais e/ou responsáveis foram solicitados a autorizar a participação das crianças recrutadas para o estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

O município de Uberlândia tem uma população estimada de 634.349 habitantes (dados de 2009) e é a sede da macrorregião sanitária do Triângulo Mineiro Norte que tem como referência uma população aproximada de 1.200.000 habitantes (IBGE, 2010).

A cidade de Uberlândia tem atualmente quarenta e três Unidades Básicas de Saúde da Família (UBSF) responsáveis pela atenção primária (preventiva e curativa) do sistema de saúde pública e oito Unidades de Atendimento Integrado (UAI), responsáveis pelo atendimento de casos leves a moderados em ambulatorios e serviços de Pronto Atendimento. A Clínica Infantil Dom Bosco é um hospital de referência para todo o município para casos leves e moderados atendidos nas UAI que necessitam de internação pediátrica.

Durante o atendimento das crianças foram obtidos os seguintes dados demográficos e clínicos relevantes: local do atendimento; idade; gênero; sintomas (febre, coriza, tosse, dificuldade para respirar e sibilância); necessidade de hospitalização ou encaminhamento para unidade de terapia intensiva e presença de alterações no Raio X de tórax (hiperinsuflação pulmonar e infiltrado alveolar) (Anexo B).

Doença respiratória aguda foi definida pela presença de coriza, tosse, dificuldade para respirar ou sibilância, com ou sem febre. Os pacientes foram categorizados conforme os dados clínicos e radiológicos como portadores de infecções de vias aéreas superiores (resfriado comum, laringotraqueobronquite e bronquite) e de infecções de vias aéreas inferiores (bronquiolite e pneumonia). O diagnóstico de bronquiolite foi definido pela

presença de sibilância e de alteração ao Raio X de tórax (hiperinsuflação pulmonar). As avaliações do Raio X foram realizados por um único observador.

3.1 Coleta do aspirado de nasofaringe

Aspirados de secreção de nasofaringe foram coletados conforme descrito por CALEGARI et al. (2005) utilizando-se um cateter estéril (sonda uretral de alívio número 06) acoplado à câmara gotejadora do equipo de soro macrogotas (o extensor do equipo foi cortado para se obter 10 cm da câmara gotejadora) e conectado a um sistema da rede de vácuo. A aspiração da secreção de nasofaringe foi realizada após instilação de 0,5 ml de soro fisiológico (0,9%) em cada narina. A secreção aspirada retida na câmara de gotejadora foi posteriormente transferida, com auxílio de ar comprimido, para o frasco estéril com soro fisiológico (solução tampão). As amostras foram acondicionadas em caixa térmica com gelo e transportadas para o Laboratório de Virologia, onde foram processadas no período máximo de até 4 horas (QUEIRÓZ et al., 2002).

3.2 Espécime Clínico

Resumidamente, a amostra clínica foi dividida em três alíquotas: i) para a reação de imunofluorescência indireta (IFI); ii) inoculação em cultura de células (CC); e iii) “in natura” para extração de ácidos nucleicos (DNA e RNA), sendo as duas últimas estocadas em freezer -80°C e em tanque de nitrogênio líquido.

Após o processamento foi então realizado o teste de imunofluorescência indireta (IFI), no qual foi utilizado uma mistura de anticorpos-monoclonais (MAb's) anti-vírus respiratórios (vírus respiratório sincicial, influenzavírus A e B, parainfluenzavírus 1, 2 e 3 e adenovírus) do *Respiratory Panel I Viral Screening and Identification by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) Kit* (Chemicon. Millipore Bedford, MA), conforme instruções do fabricante. A análise dos resultados obtidos seguiu os parâmetros estabelecidos por QUEIRÓZ et al (2002).

3.2.1 Extração de ácido nucléico do tipo RNA dos aspirados de nasofaringe

Os espécimes clínicos de aspirados nasofaringe (ANF) foram testados pela transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a presença de RNA. Os ANF foram submetidos à extração de RNA pelo método Trizol® (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA), de acordo com instruções do fabricante.

Resumidamente, em um tubo tipo *eppendorf* contendo 375µL de trizol adicionou-se 125µL da amostra clínica, sendo esta mistura vigorosamente agitada. Em seguida, adicionou-se 200µL de clorofórmio, a mistura foi novamente agitada e incubada por dois minutos à temperatura ambiente, e então foi realizada uma centrifugação à 12000xg em 4°C por 15 minutos. A fase aquosa, a qual continha o ácido nucléico do tipo RNA, foi então cuidadosamente transferida para outro tubo *eppendorf* ao qual foram adicionados 300µL de isopropanol, sendo a mistura homogeneizada por inversão, incubada por 10 minutos em temperatura ambiente, e centrifugada à 12000xg, 4°C por 10 minutos. Posteriormente, o sedimento foi lavado duas vezes com 500µL de etanol 75%, e ao final da segunda lavagem o etanol foi desprezado e o sedimento foi então ressuspensão em 20µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e 0,5µL de inibidor de RNases (Roche). Sempre que possível, o RNA foi imediatamente transcrito em DNA complementar (cDNA), quando não, este foi armazenado à -80°C.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística descritiva foi utilizada para a caracterização da amostra. Para a variável idade, que apresentou distribuição normal os dados foram expressos como média e desvio padrão. As demais variáveis foram expressas como frequências.

4 RESULTADOS

Foram obtidos aspirados de nasofaringe de 43 crianças (53,5% do gênero masculino e 46,5% gênero feminino) com idade entre de dois a 60 meses (média = 18,3 meses; mediana = 15 meses; DP = ± 16) atendidas na Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) Bairro Granada I (17/39, 5%), na Unidade de Atendimento Integrado (UAI) – Pampulha (11/ 25,5%) e na Clínica Infantil Dom Bosco (15/35%) (Tabela 1).

O diagnóstico clínico à admissão foi de: resfriado comum em 23 crianças (53,4%); laringotraqueobronquite em quatro (9,3%); pneumonia em doze (28%) e bronquiolite em quatro (9,3%) (Tabela 1). Das crianças atendidas na UBSF e na UAI-Pampulha, apenas uma (idade = 15 meses) com diagnóstico de pneumonia necessitou de hospitalização. Nenhuma criança foi internada em Unidade de Terapia Intensiva e não houve ocorrência de óbito (Tabela 1).

Detectou-se pelo menos um vírus respiratório em 22 (51,1%) amostras, sendo que 26 vírus foram detectados. Dez (38,4%) foram positivas para o VRS; dez (38,4%) para o HRV; três (11,5%) para PIV; duas (7,7%) para AdV e uma (3,8%), para o FLU A (Tabela 2)

A presença de co-infecção ocorreu em três amostras: o HRV e o VRS foram detectados em aspirado de nasofaringe de uma criança de três anos e cinco meses de idade com diagnóstico de resfriado comum; o HRV e o ADV foram detectados em amostra de uma criança com um ano e nove meses de idade com diagnóstico de pneumonia e o HRV, VRS e o ADV em outra amostra de uma criança de três anos e seis meses de idade com diagnóstico de resfriado comum.

Por meio da IFI e da RT-PCR foi possível identificar nove (21%) e dezenove (44,1%) vírus respiratórios, respectivamente, em aspirados de nasofaringe (Tabela 3)

Os vírus detectados pela IFI foram o VRS em cinco amostras, o PIV, em três e o FLU, em uma.

Pela RT-PCR foi possível detectar o VRS em seis amostras. Destas, duas eram também positivas pela IFI e cinco, negativas.

A maioria das crianças positivas para o VRS tinha idade inferior a 24 meses (n=8; 80%). O VRS foi mais frequentemente detectado nas amostras de nasofaringe de crianças com diagnóstico clínico de resfriado comum (n=5, 50%) e pneumonia (n=3, 30%) e foi o

vírus detectado na amostra da única criança, entre as atendidas na UBSF e na UAI-Pampulha, que necessitou hospitalização. (Tabela 4) (ANEXO C)

Foi possível identificar pela RT-PCR o rinovírus em dez amostras, a maioria de crianças com idade acima de 24 meses (n=5; 62%) (Tabela 4) e com infecções de vias aéreas superiores: resfriado comum (n=6) e traqueobronquite (2). O HRV foi detectado em uma criança 21 meses idade com pneumonia e em outra com quatro meses de idade com bronquiolite (Tabela 5).

Todas as amostras positivas para o PIV e o FLU pela IFI foram negativas pela RT-PCR. O PIV foi identificado em uma criança com quatorze meses de idade com resfriado comum e em duas crianças, sendo uma com dois meses e outra com 24 meses de idade ambas com pneumonia. O FLU foi detectado em uma criança de quatro meses de idade com diagnóstico de resfriado comum.

Na UBSF-Granada¹, foram coletadas amostras de 17 crianças e detectados 5 HRV, 5 VRS, e 1 AdV, na UAI- Pampulha, foram detectados 2 HRV, 3VRS, 1 FLU, 1 PIV em amostras de 11 crianças e na Clínica Infantil Dom Bosco, 3 HRV, 2VRS, 2PIV e 01 AdV.

Os adenovírus foram identificados pela RT-PCR em co-infecções com o HRV em duas amostras: uma criança de um ano e nove meses de idade com pneumonia e outra de três anos e seis meses com resfriado comum.

O influenzavírus foi detectado em apenas uma amostra (IFI) de criança com resfriado comum com idade de quatro meses.

Em 2008 foram coletadas nove amostras, nos meses de fevereiro, março, abril, maio e dezembro, e tiveram oito vírus respiratórios detectados. Nos meses fevereiro, março, abril, maio, junho, julho, agosto e novembro de 2009, 24 amostras foram coletadas e quatorze vírus detectados e dez amostras foram coletadas em 2010 nos meses de janeiro, fevereiro e maio, e quatro vírus foram detectados (Tabela 6).

No acumulado dos três anos, o rinovírus esteve presente em todas as estações do ano, e o vírus respiratório sincicial no verão e outono (Figura 1)

Tabela 1. Características demográficas e clínicas de crianças atendidas na atenção primária e secundária à saúde no período de 2008-2010, em Uberlândia, MG

Local de coleta (n/%)	Granada (17/39,5%)	Pampulha (11/25,5%)	D. Bosco (15/35%)	Total (43/100%)
Idade média em meses (DP)	19,6(16,8)	22(15,1)	14(15,8)	18,3(16)
Gênero masculino (%)	10(58,8)	5(45,4)	8(53,3)	23(53,4)
Sinais e Sintomas (%)				
Febre	10(59)	10(90,9)	14(93,3)	34(80)
Coriza	16(94,1)	9(82)	4(26,6)	29(67,4)
Tosse	16(94,1)	11(100)	15(100)	42(97,6)
Dispneia	-	4(36,3)	15(100)	19(44,1)
Sibilos	-	3(27,2)	15(100)	18(42)
Alteração Rx (%)				
Hiper-insuflação	-	-	10(66,6)	10(23,2)
Infiltrado intersticial	-	-	12(80)	12(28)
Infiltrado alveolar	-	2(18,1)	3(20)	5(11,6)
IVAS – n (%)				27(62,7)
Resfriado comum	17(100)	6(54,5)	-	23(53,4)
Traqueobronquite	-	3(27,2)	1(6,6)	4(9,3)
IVAI – n (%)				16(37,2)
Bronquiolite	-	-	4(26,6)	4(9,3)
Pneumonia	-	2(18,1)	10(66,6)	12(28)
Hospitalização – n(%)	-	1(9)	15(100)	16(37,2)

IVAS: infecção das vias aéreas superiores; IVAI: infecção das vias aéreas inferiores

Tabela 2. Vírus respiratórios identificados nas crianças atendidas na UBSF-Granada, UAI-Pampulha e Clínica Infantil Dom Bosco no período de 2008 -2010 em Uberlândia, MG

Vírus	Local n (%)			Total
	Granada	Pampulha	Dom Bosco	
	11	7	8	26
VRS	5	3	2	10
HRV	5	2	3	10
PIV	-	1	2	3
FLU	-	1	-	1
AdV	1	-	1	2

VRS: vírus respiratório sincicial; HRV: rinovírus, PIV: parainfluenzavírus, FLU: influenzavírus; AdV: adenovírus

Tabela 3. Desempenho dos métodos diagnósticos na detecção de vírus respiratórios nas amostras de aspirado de nasofaringe de crianças atendidas na atenção primária e secundária à saúde no período de 2008-2010, em Uberlândia, MG

Vírus	IFI	RT-PCR
VRS	5	7 ^a
HRV	-	10
PIV	3	-
FLU	1	-
Adv	-	2
Total	9(21%)	19(44,1%)

^a RT-PCR detectou cinco VRS não detectados pela IFI e confirmou o VRS detectado pela IFI em duas amostras

Tabela 4. Distribuição de vírus respiratórios segundo a faixa etária de crianças atendidas na atenção primária e secundária à saúde no período de 2008-2010, em Uberlândia, MG

Vírus	Faixa Etária (meses)			Total
	≤3	4 a 24	≥24	
VRS	1	7	2	10
HRV		5	5	10
PIV	1	1	1	3
FLU	-	1	-	1
AdV	-	2	-	2
Total	2	16	8	26

VRS: vírus respiratório sincicial; HRV: rinovírus, PIV: parainfluenzavírus, FLU: influenzavírus; AdV: adenovírus

Tabela 5. Distribuição de vírus respiratórios identificados segundo o diagnóstico clínico de crianças atendidas na atenção primária e secundária à saúde no período de 2008-2010, em Uberlândia, MG

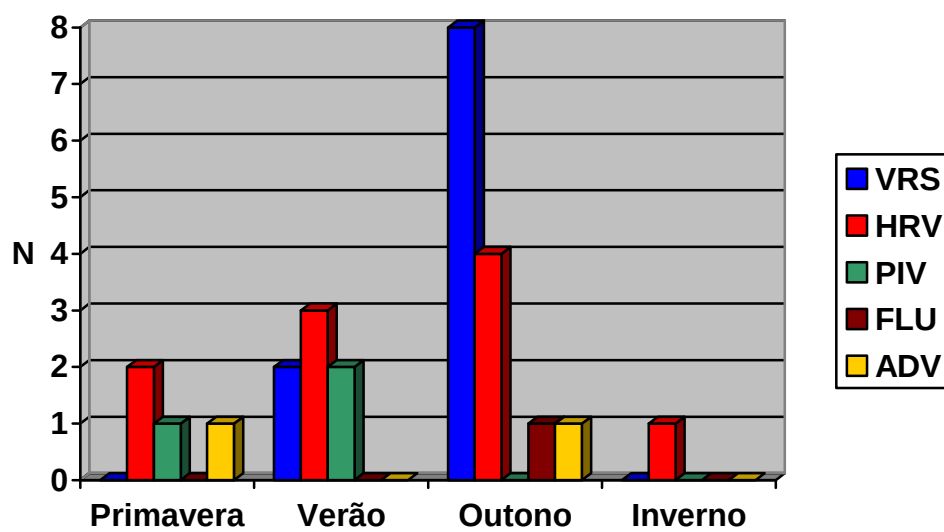
Vírus	Diagnóstico clínico (n)				
	Resfriado Comum	Traqueobronquite	Pneumonia	Bronquiolite	Total
VRS	5	1	3	1	10
HRV	6	2	1	1	10
PIV	1	-	2	-	3
FLU	1	-	-	-	1
AdV	-	-	2	-	2
Total	13	3	8	2	26

VRS: vírus respiratório sincicial; HRV: rinovírus, PIV: parainfluenzavírus, FLU: influenzavírus; ADV: adenovírus

Tabela 6. Distribuição de vírus respiratórios detectados nas amostras de nasofaringe de crianças atendidas na atenção primária e secundária à saúde no período de 2008-2010, em Uberlândia, MG

Vírus	2008 (n)	2009 (n)	2010 (n)
VRS	3	5	2
HRV	4	5	1
PIV	1	1	1
FLU	-	1	-
AdV	-	2	-
Total	8	14	4

Figura 6. Distribuição sazonal dos vírus detectados nos aspirados de nasofaringe de crianças atendidas na atenção primária e secundária à saúde no período de 2008-2010, em Uberlândia, MG



5 DISCUSSÃO

A investigação epidemiológica de vírus presumidamente não colonizadores em crianças menores de cinco anos de idade atendidas em unidades de atenção primária e secundária com DRA permitiu a detecção, por meio das técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) e da transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), de pelo menos um vírus em 51,1% dos espécimes de aspirado de nasofaringe, sendo o HRV (10/38,5%) e o VRS (10/38,5%) os mais prevalentes.

Uma relação causal é habitualmente assumida entre a identificação de agente infeccioso no aspirado de nasofaringe e a infecção do trato respiratório. No entanto, tal inferência deve ser vista com cautela, pois esse pressuposto apresenta limitações. Métodos invasivos como broncoscopia e punção pulmonar não são exequíveis especialmente em crianças sem sinais de gravidade dos sintomas respiratórios. Além disso, recentes estudos indicam que vírus respiratórios, em especial o HRV, são identificados em torno de 40% em crianças assintomáticas (VAN BENTEN et al., 2003). Embora os métodos moleculares têm aumentado a detecção de patógenos virais, não se pode estabelecer inequívoca inferência causal com as doenças respiratórias.

Em geral, os estudos que tratam da investigação da identificação de agentes virais nas doenças respiratórias são conduzidos em crianças que necessitam hospitalização, portanto com manifestações clínicas mais graves (ARDEN et al., 2006). Nestes, é possível a identificação de pelo menos um vírus respiratório em até 80% das amostras de aspirado de nasofaringe quando se utiliza a IFI e/ou a RT-PCR (MIRON et al., 2010). Nas infecções do trato respiratório superior (em especial no resfriado comum) e inferior o HRV e o VRS são os agentes virais mais frequentemente observados, respectivamente (VAN DER ZALM et al 2009b; CHUNG et al., 2007; YOSHIDA et al., 2010). Entretanto, a frequência de vírus respiratórios nestes estudos varia de acordo com a idade, a gravidade dos sintomas respiratórios, a sazonalidade, o sítio de infecção (vias aéreas superiores ou vias aéreas inferiores), local de atendimento (creches, unidades básicas de saúde, pronto atendimento, enfermarias ou unidades de terapia intensiva) e a técnica de detecção viral (cultura, imunofluorescência, ELISA e PCR) (SOUZA et al., 2003; HEIKKINEN; JARVINEN, 2003).

Em Uberlândia estudos de investigação viral foram realizados anteriormente, no entanto as amostras foram de crianças atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade

Federal de Uberlândia, hospital público de referência para média e alta complexidade nos municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. COSTA et al (2006) estudaram 379 amostras de aspirados de nasofaringe avaliadas pela IFI e RT-PCR e identificaram pelo menos um agente viral em 75% dos espécimes. O vírus respiratório sincicial e o rinovírus foram os agentes virais mais detectados (26,4% e 29,5%, respectivamente. CALEGARI et al (2005) estudaram 436 aspirados de nasofaringe de crianças com bronquiolite e verificaram que 27,3 % eram positivas para o VRS (detectado por IFI). Neste estudo, a presença de VRS ocorreu principalmente em crianças menores de um ano de idade, com maior número de internações e com necessidade de ventilação mecânica. Portanto, os estudos acerca da prevalência da etiologia viral em doenças respiratórias agudas em crianças na cidade de Uberlândia, MG, indicam que o VRS e o HRV são os mais prevalentes tanto nos serviços de atenção primária e secundária quanto na terciária.

Há poucos relatos na literatura acerca da prevalência de vírus respiratórios em crianças com sintomatologia leve ou moderada que em geral são atendidas em unidades de atendimento primário e secundário (RODRIGUES et al., 2004; SOUZA et al., 2003).

VAN DER ZALM et al (2009b) estudaram a prevalência de vários patógenos detectados por método molecular (PCR) numa coorte de lactentes do nascimento até um ano de idade acompanhados quanto a presença de sintomas respiratórios por meio de questionários diários respondidos pelos pais. Pelo menos um patógeno foi identificado em 85% de 668 aspirados de nasofaringe de 305 crianças, sendo que o HRV (73%), o VRS (11%) e o coronavírus (8%) foram os vírus respiratórios mais frequentes. As infecções causadas pelo VRS foram correlacionadas com a presença de sibilância, febre e necessidade de atendimento médico. No entanto, a alta prevalência (treze vezes maior) e a duração mais prolongada das infecções causadas pelo HRV, quando comparadas ao VRS neste estudo, sublinham a importância cada vez mais evidente do HRV na transcendência das doenças respiratórias agudas em lactentes jovens.

Em outro estudo, o HRV foi o patógeno mais prevalente em 230 espécimes clínicos de lactentes menores de 12 meses de idade com (38/165; 23%) e sem (14/65; 22%) sintomas respiratórios, seguido do coronavírus (8% e 9%, respectivamente) (VAN DER ZALM et al., 2009a).

ALPER et al (2008) detectaram por meio da PCR presença de pelo menos um vírus respiratórios em 270 (64%) e 145 (27%) aspirados de nasofaringe de 170 crianças com

idade entre um e oito anos com e sem sintomas respiratórios, respectivamente. O HRV foi identificado em 64,3% das amostras PCR positivas e o VRS, em 7%.

NIANG et al (2010) verificaram que, entre junho e dezembro de 2007, numa comunidade rural do Senegal, em 88 episódios em 67 crianças menores de cinco anos de idade com febre e sintomas respiratórios (sobretudo de vias aéreas superiores), os vírus mais prevalentes foram o FLU (30,5%), o VRS (15,9%), o HRV (9,7%) e o coronavírus (7,3%), identificados por meio de cultura viral ou *multiplex* RT-PCR. Os achados deste estudo ressaltam, mais uma vez, a importância do HRV e coronavírus como causadores de doenças respiratórias das vias aéreas superiores.

Apenas um estudo brasileiro tratou da prevalência de vírus respiratórios em crianças não hospitalizadas. SOUZA et al (2003) observaram, numa creche na cidade de Salvador-BA, a presença de sintomas respiratórios de vias aéreas superiores e inferiores (associados ou não com febre) em uma coorte de crianças com idade entre dois e 24 meses. A identificação de pelo menos um vírus respiratório por cultura viral e imunofluorescência foi verificada em 116 (43%) dos 271 aspirados de nasofaringe analisados. Destas, 67 (52%) foram positivas para o HRV e 19 (15%), para os enterovírus. O VRS foi identificado em apenas cinco (4%) espécimes clínicos.

Portanto, os nossos achados e os dos estudos acima apresentados sublinham a importância do HRV como principal agente etiológico em crianças com sintomas respiratórios leves ou moderados e que não necessitam hospitalização. Vale ressaltar que a utilização de métodos moleculares possibilitou, por outro lado, verificar a relevância do coronavírus nestas situações.

Oito das dez amostras HRV positivas do presente estudo eram de crianças com infecções de vias aéreas superiores e em duas crianças com diagnóstico de infecções de vias aéreas inferiores. Com o desenvolvimento de técnicas moleculares para a amplificação de ácidos nucleicos, a importância do HRV como agente etiológico das IVAI tem sido frequentemente demonstrada (FREYMUTH et al., 2006; CHOI et al., 2006; MILLER et al., 2007; BANERJI et al., 2009; GERNA et al., 2009; LOUIE et al., 2009; TAPPAREL et al., 2009), bem como sua associação com o desencadeamento e desenvolvimento de sibilância recorrente e asma (CHUNG et al., 2007).

PAPADOPOULOS et al (2002) demonstraram a replicação do HRV no trato respiratório inferior e outros estudos verificaram a presença do HRV em crianças menores

de cinco anos de idade com sintomas respiratórios e sibilância (SOUZA et al., 2003; CHUNG et al., 2007).

O HRV foi o vírus respiratório mais prevalente (33,3%) em todas as faixas etárias, seguido do VRS (13,8%) e hBoV (13,8%), em 308 espécimes clínicos de aspirados de nasofaringe em 231 crianças (idade entre um mês e cinco anos) hospitalizadas por sibilância aguda (125 com bronquiolite e 106, com exacerbação de asma) em Seul (Coréia) (CHUNG et al., 2007). Este estudo reforça a evidência de que utilização da RT-PCR permitiu considerar o HRV como o agente viral predominante detectado nos episódios de sibilância aguda especialmente em crianças acima de dois anos de idade.

Treze patógenos virais foram investigados, por meio de *multiplex* PCR, em 958 crianças vietnamitas hospitalizadas por com infecção respiratória aguda de vias aéreas superiores e inferiores (YOSHIDA et al., 2010). O diagnóstico de bronquiolite e de pneumonia (com confirmação radiológica) foi realizado em 195 e 268 crianças, respectivamente. O rinovírus (28%), o VRS (23%) e o influenza (15%) foram os mais prevalentes nas 659 (69%) amostras de nasofaringe em que foi possível a detecção de pelo menos um vírus respiratório. As infecções pelo rinovírus ocorreram principalmente em crianças com idade entre doze e 24 meses.

Entre 2003 e 2004, ARDEN et al (2006) identificaram, por meio de RT-PCR, o HRV em 140 (44,4%) de 315 amostras de aspirados de nasofaringe de indivíduos (78,9% crianças menores de cinco anos) com suspeita de infecção de vias aéreas inferiores admitidas em hospitais metropolitanos e regionais no Estado de Queensland (Austrália). O HRV, e em especial o HRV-A1, foi detectado como agente único em um terço das amostras HRV positivas.

Estudo realizado no Estado do Rio de Janeiro identificou por meio de PCR convencional e *real-time*, pelo menos um vírus em 63 (30,7%) das 205 amostras de *swab nasal* de crianças e adolescentes com idade entre um mês e quinze anos hospitalizadas por infecções de vias aéreas superiores e inferiores. O HRV foi detectado em 33 (16%). (ALBUQUERQUE et al., 2009)

Estudo retrospectivo conduzido na Tailândia analisou 87 aspirados de nasofaringe por meio de RT-PCR de 84 crianças com doença aguda do trato respiratório inferior e observou a prevalência de HRV e do VRS em 30% e 16%, respectivamente. O HRV-C foi identificado em 55% dos episódios em que se identificou unicamente o HRV (LINSUWANON et al., 2009).

CALVO et al (2008) detectaram o HRV (*multiplex* PCR) em 25% (85/382) de crianças menores de dois anos de idade hospitalizadas por doença respiratória aguda. As infecções pelo HRV ocorreram em crianças com idade média de 7,59 ($\pm 6,3$ meses), a maioria (67,1%) era do sexo masculino. A co-infecção com outros vírus respiratórios (em especial o Adv e o VRS) foi observada em 34 (40%) dos casos e os diagnósticos clínicos finais foram: sibilância recorrente (48,2%), bronquiolite (36,5%) e IRTS (8,2%) e pneumonia (3,5%). Quando comparados com os pacientes VRS positivos, os rinovírus positivos ocorreram mais freqüentemente em pacientes do sexo masculino e apresentaram menor necessidade de suporte de oxigênio; o diagnóstico de bronquiolite foi mais freqüente nos pacientes VRS. GARCÍA-GARCÍA et al (2010) verificaram que crianças com episódios de sibilância aguda grave HRV positivas tinham maior média de idade, maior tempo de hospitalização e apresentaram menor freqüência de febre e hipoxemia que os VRS positivos.

A presença de co-infecção ocorreu em três amostras no presente estudo, sempre com a presença do HRV: HRV/VRS (resfriado comum); HRV/Adv (pneumonia) e HRV/VRS/Adv (resfriado comum). A utilização de métodos moleculares para a detecção viral tem contribuído na identificação de casos de co-infecção (em geral em torno de 30% das IVAI) entre os HRV e outros vírus respiratórios (ABERLE et al., 2005, JACQUES et al., 2006, CALVO et al., 2008), em especial o VRS (PAPADOPOULOS et al., 2002, MILLER et al., 2007, PARANHOS-BACCALA et al., 2008, MARGUET et al., 2009), hMPV, PIV, os FLU, hBoV, Adv e enterovírus (ABERLE et al., 2005, CALVO et al., 2007, MANOHA et al., 2007, CILLA et al., 2008, BANERJI et al., 2009). Em crianças abaixo de 24 meses com IVAI, o agente viral único mais freqüente da bronquiolite é o VRS e as co-infecções são associadas principalmente com o hBoV e o HRV (MIRON et al., 2010). Permanece incerta a relação entre infecção múltipla viral e doença respiratória aguda mais grave, que necessita maior tempo de hospitalização e que acomete principalmente lactentes (PAPADOPOULOS et al., 2002, CALVO et al., 2007, VAN DER ZALM et al., 2009).

A utilização da RT-PCR, quando comparada com a IFI no presente estudo, dobrou a capacidade de detecção viral em crianças com doenças respiratórias agudas. Esses achados são semelhantes aos referidos em outros estudos que compararam métodos moleculares (PCR convencional e RT-PCR) com os tradicionais (imunofluorescência e cultura viral) em crianças hospitalizadas por doenças respiratórias (FREYMUTH et al.,

2006; KUYPERS et al., 2006). A utilização da PCR convencional permitiu dobrar a taxa de identificação de seis vírus respiratórios em crianças hospitalizadas por infecções virais agudas (WEINBERG et al., 2004) e aumentar a prevalência de seis vírus respiratórios de 26,9%, detectados por IFI, para 33,8% (SYRMIS et al., 2004).

Com a técnica de PCR foi possível aumentar a detecção de VRS em 316 aspirados de nasofaringe de crianças menores de dois anos de idade com doenças agudas do trato respiratório de 6,3% (cultura viral) e 7,9% (IFI) para 11,4% (REIS et al., 2008). Uma amostra foi positiva apenas pela IFI e onze (31,4%) apenas pela RT-PCR.

Durante um ano, 1138 aspirados de nasofaringe de crianças com doenças respiratórias agudas foram testadas quanto à presença dos seguintes vírus: vírus sincicial respiratório (VSR), vírus influenza do tipo A (Flu A), vírus parainfluenza 1, 2 e 3 (PIV1, PIV2 e PIV3), metapneumovírus humano (MPV) e adenovírus (AdV), por meio da IFI e da PCR em tempo real (KUYPERS, 2006). Pelo menos um vírus foi detectado em 436 (38,3%) e em 608 (53,4%) dos espécimes clínicos por IF e PCR, respectivamente. A qualidade das amostras foi considerada inadequada para IF em 52 (4,6%) amostras e destas, 13 (25%) eram PCR positivas. Por outro lado, apenas 18 (1,6%) espécimes clínicos não puderam ser analisados por PCR e destes, somente um era IF positivo.

Estudo realizado na Índia entre abril de 2005 e março de 2007 identificou a presença de agente viral em 130 e 79 de 301 aspirados de nasofaringe pelas técnicas de *multiplex* PCR e cultura viral/IFI, respectivamente, de crianças que procuraram ambulatorios (137) ou que foram hospitalizadas (135) por infecções respiratórias. Por meio dos métodos tradicionais não foi possível detectar infecção por mais de um agente viral (BHARAJ et al., 2009). A percentagem de detecção viral por *multiplex* PCR foi maior nos pacientes admitidos nos ambulatorios (33,7%) do que naqueles que necessitaram hospitalização (22,8%). Os autores recomendam a utilização do *multiplex* PCR para o diagnóstico de doenças respiratórias agudas, pois oferece uma resposta rápida, é sensível e é satisfatória a relação custo/benefício.

Estudo que tratou do desempenho comparativo entre quatro *multiplex* PCR e métodos tradicionais (IFI e isolamento viral) na detecção de vírus respiratórios em 263 crianças internadas por doença respiratória aguda observou que o *multiplex* PCR foi capaz de identificar 124 vírus em amostras IFI/cultura viral negativas (FREYMUTH et al., 2006). A prevalência de espécimes clínicos positivos foi maior quando utilizada o *multiplex* PCR

(92% versus 72,3%). Os autores ressaltaram que o *multiplex* PCR além de mais sensível, possibilita a detecção viral mais rápida e o custo é menor que os métodos tradicionais.

O presente estudo apresenta limitações metodológicas principalmente quanto ao número (pequeno) dos espécimes clínicos. A opção por uma amostragem de conveniência limita a generalização de resultados encontrados. Além disso, os aspirados de nasofaringe não foram obtidos de maneira uniforme entre as diversas épocas do ano, o que impossibilitou o estudo da distribuição sazonal dos vírus respiratórios identificados. No entanto, a utilização de técnica molecular (RT-PCR) contribuiu para o conhecimento da etiologia viral das doenças respiratórias de vias aéreas superiores e inferiores em crianças com sintomatologia leve ou moderada.

Estudos com recrutamento de maior número de crianças com doenças respiratórias das vias aéreas superiores e inferiores em unidades de saúde de atenção primária e secundária, pareadas com crianças sem sintomas respiratórios, e a utilização de metodologias moleculares para a identificação dos vírus respiratórios emergentes permitirão conhecer melhor os aspectos epidemiológicos destas doenças.

6 CONCLUSÕES

- Vinte e seis vírus respiratórios foram detectados em 43 aspirados de nasofaringe de crianças com DRA com idade abaixo de cinco anos atendidas em serviços públicos de atenção primária e secundária na cidade de Uberlândia, MG.
- Pelo menos um vírus respiratório foi detectado em 22 (51,1%) amostras. Os vírus mais prevalentes foram o VRS (10/38,4%) e o HRV (10/38,4%). O PIV foi identificado em três (11,5%) espécimes clínicos; o AdV em dois (7,7%) e FLUA em um (3,8%).
- Co-infecção ocorreu em três amostras (HRV+VRS; HRV+ADV e HRV+VRS+ADV).
- A IFI e a RT-PCR detectaram nove (21%) e dezenove (44,1%) vírus respiratórios, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M.C.M.; et al .Novel Respiratory Virus Infections in Children, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** p. 1-7, May, 2009.

ALPER, C.M.; et al. Upper respiratory virus detection without parent-reported illness in children is virus-specific. **Journal of Clinical Virology.** v. 43, p. 120-22, 2008.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. Diagnosis and management of bronchiolitis. **Pediatrics.** Evanston, v. 118, n. 4, p. 1774-1793, Oct, 2006.

ANDREOLETTI, L.; et al. Differential detection of rhinoviruses and enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. **J Med Virol.** v. 61, n.3, p. 341-6. Jul, 2000.

ABERLE, J. H., et al. Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on clinical course of disease and interferon-gamma response. **Pediatr Infect Dis J.** v. 24, P. 605-10, 2005.

ARDEN, K.E., et al. Frequent Detection of Human Rhinoviruses, Paramyxoviruses, Coronaviruses, and Bocavirus During Acute Respiratory Tract Infections. **Journal of Medical Virology.** v. 78, p. 1232-40, 2006.

ARRUDA, E. e HAYDEN, F. G. Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR. **Mol Cell Probes.** v.7, n.5, p. 373-9. Oct, 1993.

ARRUDA, E.; et al. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. **Journal of Infectious Diseases.** v. 164, p. 252-258, 1991.

BANERJI, A., et al. Risk factors and viruses associated with hospitalization due to lower respiratory tract infections in Canadian Inuit children: a case-control study. **Pediatr Infect Dis J.** v. 28, p. 697-701, 2009.

BAUM, S.G. Adenovírus In Mandell, G.L.; Benett, J.E.; Dolin, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases 4.** p. 1382-7, 1995.

BENGUIGUI, F.J.L.; et al. Infecções Respiratórias em Crianças. **Organização Mundial de Saúde**. Washington. 496p 1998.

BHARAJ, P., et al. Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. **Virology Journal**. v. 6, n. 89, p. 1-11, 2009.

BJORNSEN, C.L.; JOHNSON, D.W. Croup. **Lancet**. v. 371, p. 329-39, Jan, 2008.

BOON HUAN, T., et al. The incidence of Human Bocavirus Infection Among Children Admitted to Hospital in Singapore. **Journal of Medical Virology**. v. 81, p.82-89, 2009.

CALEGARI, T.; et al. Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus in children attended in a public hospital in Midwestern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**. v. 9, p. 154-159, 2005.

CALVO, C.;et al. Multiple Simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infectious in Spain. **Journal of Clinical Virology**. v.42, p. 268-272, 2008.

CARNEIRO, B.M.; et al. Detection of all four human metapneumovirus subtypes in nasopharyngeal specimens from children with respiratory disease in Uberlândia, Brasil. **J. Med. Virol.** v. 81, n. 10, p. 1814-8, Oct, 2009.

CHAPMAN, R., et al. The epidemiology of tracheobronchitis in pediatric practice. **Am J Epidemiol**. v. 114, p. 786–97, 1981.

CHERRY, J.D. Clinical practice Croup. **N. Engl. J. Med**. v. 358, n. 4, p. 384-91, Jan, 2008.

CHERRY, J.D. The common cold. In: FEIGIN, R.D and CHERRY, J.E. Textbook of **Pediatric Infectious Diseases**. Ed. Philadelphia, p. 155-60, 1987.

CHOI, E. H., et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. **Clin Infect Dis**. v. 43, p. 585-92, 2006.

CHUNG, J.Y., et al. Detection of viruses Identified Recently in Children with Acute Wheezing. **Journal of Medical Virology**. v. 79, p. 1238- 1243, 2007.

CILLA, G., et al. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. **J Med Virol.** v. 80, p. 1843-9, 2008.

_____. Respiratory syncytial virus. In: Fields' **Virology**. 3 ed, vol 2, Fields, B, Knipe, D, Howley, P, et al (Ed), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996.

COSTA, L. F. et al. 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, May, 2006.

COUNIHAN, M. E.; et al. Human parainfluenza virus-associated hospitalizations among children less than five years of age in the United States. **Pediatric Infect Diseases Journal.** v. 20, n. 7, p. 646-653. 2001.

CROWE, J. E., JR. e WILLIAMS, J. V. Immunology of viral respiratory tract infection in infancy. **Paediatr Respir Rev**, v. 4, n. 2, p. 112-9, Jun, 2003.

DENNY, F., et al. Croup: an 11-year study in a pediatric practice. **Pediatrics.** v. 71, p. 71–76, 1983.

DOERFLER, W.; BOHM, P. The molecular repertoire of adenoviruses. **Current topics in Microbiology & Immunology.** v. 199, 1995.

DOMINGUES, S.R.; et al. Detection of four Human Coronaviruses in Respiratory Infections in Children: A one-year study in Colorado. **Journal of Medical Virology.** v. 81, p. 1597-604, 2009

DURBIN, A.P.KARRON, R.A. Progress in the development of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. **Clin Infect Dis.** v. 15 n. 12, p. 1668-77, 2003.

ECHEVARRIA, J. E.; et al. 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, May, 1998.

ERDMAN, D. D.; et al. Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. **Emerging Infectious Diseases.** v. 8, p. 269-277, 2002.

ESPOSITO, S.; et al. Impact of Human Bocavirus on Children and Their Families. **J Clin Microbiol.** v. 46, n.4, p. 1337–42, Apr, 2008 .

FACANHA, M. C; PINHEIRO, A C. Doenças respiratórias agudas em serviços de saúde entre 1996 e 2001, Fortaleza, CE. **Rev. Saúde Pública.** São Paulo, v. 38, n. 3, jun, 2004.

FENTON, C.; SCOTT, L. J.; PLOSKER, G.L. Palivizumab: A Review of its Use as Prophylaxis for Serious Respiratory Syncytial Virus Infection. **Pediatr Drugs.** v. 6, n. 3, p. 177-197, 2004.

FERGUSON, N. M.; GALVANI, A. P.; BUSH, R. M.; Ecological and immunological determinants of influenza evolution. **Nature.** v. 422, p. 428-433, 2003.

FIGUEIREDO, L.T.M. Pneumonias virais: aspectos epidemiológicos, clínicos, fisiopatológicos e tratamento. **J. bras. Pneumol.** São Paulo, v. 35, n. 9, Set, 2009.

FISCHER, G. B.; MENDONÇA, P.C.J. Bronquiolite viral aguda. In: FERREIRA, O. Pneumologia, Cadernos de Terapêutica, 2a. ed. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 1991.

FOX, J.P.; et al. Rhinoviruses in Seattle families. 1975-1989. **Am. J. Epidemiol.** v. 122, p. 830-46, 1985.

FREYMUTH, F., et al. Comparison of multiplex PCR Assays and Conventional Techniques for the children Admitted to Hospital with an Acute Respiratory illness. **J. Med. Virol,** v. 78, p. 1498-1504, 2006.

GARCÍA-GARCÍA, M.L. et al. Human bocavirus infections in Spanish 0-14 year-old: clinical and epidemiological characteristics of an emerging respiratory virus. **An Pediatr, (Barc).** v. 67, n. 3, p. 212-9, Sep, 2007.

GARCÍA-GARCÍA, M.L., et al. Role of Emerging Respiratory viruses in Children with Severe Acute Wheezing. **Pediatric,** v.45, p. 585-591, 2010.

GERNA, G., et al. Correlation of rhinovirus load in the respiratory tract and clinical symptoms in hospitalized immunocompetent and immunocompromised patients. **J Med Virol.** v. 81, p. 1498-507, 2009.

GREENBERG , H. B.; PIEDRA, P.A. Immunization against viral respiratory disease: a review. **Pediatr Infect Dis J.** v. 23, n. 11, p.S254-61, 2004.

GWALTNEY J. M. Rhinovirus. In: EVAN, A.S. Viral Infections of Human: Epidemiology and Control. Nova Iorque. Plenum Medical Book Co. p. 491-517, 1982.

GWALTNEY, J. M.; HANINZ, B.A. Rhinovirus. In RICKMAN, D.D.; WHITTEY, R.J.; HAYDEN, F.G. (Eds). **Clinical Virology**. 2 Ed. ASM Press, Washington, p. 995-1018, 2002.

HART, C A.; CUEVAS, L E. Acute respiratory infections in children. **Rev. Bras. Saúde Mater. Infant.** Recife, v. 7, n. 1, Mar, 2007.

HEIKKINEN, T.; JARVINEN, A. The common cold. **Lancet**. v. 361, p. 51-59, 2003.

HEIN, N.; et al. A coleta simultânea de *swab* nasal e do aspirado de nasofaringe para pesquisa de vírus respiratórios em crianças hospitalizadas. **Pediatrics (São Paulo)**, São Paulo, v. 25 n. 3, p. 84-90, 2003.

HENDLEY, J. O, GWALTNEY, J.M. Mechanisms of transmission of rhinovirus infections. **Epidemiol. Rev.** v. 10, p. 242-58, 1988.

HENRICKSON, K. J. Parainfluenza viruses. **Clin Microbiol Rev.** v.16, n.2, p.242-64. Apr, 2003.

_____.Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. **Pediatr Infect Dis J.** v. 23, p. S6-10, 2004.

HERNANDEZ, H. Resfriado Comum. In: BENGUIGUI, F.J.L. Infecções respiratórias em crianças. **Organização Mundial de Saúde**. Washington. p. 169-82, 1998.

HOOGEN, B. G. V.; et al. A newly discovered human metapneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nature Medicine**, v.7, p. 719-724, 2001.

IBGE. **Cidades**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. acesso em maio 2010.

JACQUES, J., et al. Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. **J Clin Virol**, v. 35, p. 463-6, 2006.

KARRON, R. A. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. In: PLOTIN, S.A.; ORENSTEIN, W.A.; OFFIT, P.A. editors. **Vaccines**. 5 ed, Saunders-Elsevier, p. 1283-93, 2008.

KIENY, M. P.; GIRARD, M. P. Human vaccine research and development: an overview. **Vaccine**, v. 23, p. 5705-7, 2005.

KOTANIEMI-SYRJANEN, A.; et al .Rhinovirus-induced wheezing in infancy--the first sign of childhood asthma? **J Allergy Clin Immunol**. v.111, n.1, p. 66-71, Jan, 2003.

KUYPERS, J.; et al. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. **J Clin Microbiol**. v. 44, n. 7, Jul, p. 2382-8, 2006.

LAMB, R.A.; KOLAKOSKY, D. Paramyxoviridae: The viruses and their Replication. Fieldz Virology , 3 Ed. Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia, p. 1177-1203, 1996.

LAMB, R.A.; KRUG, R.M.Ortomyxoviridae: The viruses and their Replication. Fieldz Virology , 3 Ed. Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia, p. 1353-1395, 1996.

LINSUWANON, P., et al. High prevalence of human rhinovirus C infection in Thai children with acute lower respiratory tract disease. **Journal of infection**. Elsevier. v. 59, p. 115-121, Jun, 2009.

LOUIE, J. K., et al. Rhinovirus associated with severe lower respiratory tract infections in children. **Pediatr Infect Dis J**. v. 28, p. 337-9, 2009.

MARGUET, C.; et al. In Very Young Infants Severity of Acute Bronchiolitis Depends On Carried Viruses. **PLoS ONE**. v. 4, n. 2, p. 1-6, 2009.

MCCONNOCHIE, K.M. Bronchiolitis. What'sinthename? **Am J Dis**. v. 137, p. 11-3, 1983.

MILLER., et al. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. **J Infect Dis**. v. 195, p. 773-81, 2007.

MIRON, D., et al. Sole Pathogen in Bronchiolitis. Is there a role for other Organisms Apart from Respiratory Syncytial Virus? **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 29, n. 1, 2010.

MODLIN, J.F. Coxsackieviruses, echovirus y nuevos enterovirus. In. MANDELL, DOUGLAS, BENNETT. **Doenças Infecciosas, Princípios e Práticas**. 3a. Edição, Ed. Médica Pan-americana 1991; p. 1442-59.

MOSCONA, A. Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. **J Clin Invest**. v. 115, n.7, p. 1688-98. Jul, 2005.

MOURA, F. E. A.; et al. Estudo de infecções respiratórias agudas virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p 275-282, 2003.

NASCIMENTO, J. P.; et al. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 33, n.4, p. 287-96, Jul-Aug, 1991.

NIANG, M.N.; et al. Viral Etiology of Respiratory Infections in children Under 5 years old living in Tropical Rural Areas of Senegal: The EVIRA Project. **Journal of Medical Virology**. v. 82, p. 866-872, 2010.

NOLTE, F.S. Molecular diagnostics for detection of bacterial and viral pathogens in community- acquired pneumonia. **Clin Infect Dis**. v. 47, n. 3, p. S 123-6, 2008.

OCHOA SANGRADOR, C.; DIOS, J. G. Conferencia de Consenso sobre bronquiolitis aguda (II): epidemiología de la bronquiolitis aguda. Revisión de la evidencia científica. **Anales de Pediatría**, v. 72, n. 3, p. 221e1-222e26, 2010.

OLIVEIRA, J. F.; DE SÁ, J. P. O. e CRUZ, M. E. M. Identificação e monitoração do vírus influenza A e B, na população de Maceió. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n.1. 2004.

PAPADOPOULOS, N. G., et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, p. 1285-9, 2002.

PAPADOPOULOS, N. G., et al. Rhinoviruses infect the lower Airways. The journal of Infectious Disease. v. 181, p. 1875-84, 2000.

PAPPAS, D. E.; et al. Symptom profile of common colds in school-aged children. **Pediatr Infect Dis J**, v. 27, n. 8, 2008.

PARANHOS-BACCALA, G., et al. Mixed respiratory virus infections. **J Clin Virol**, v. 43, p. 407-10, 2008.

PITKARANTA, A.; et al. Detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus infections in acute otitis media by reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Pediatrics**, v. 102, n. 2, p. 291-5, Aug, 1998.

PITREZ, P. M. C.; et al. Rhinovirus and acute bronchiolitis in young infants. **Jornal de Pediatria**. v. 81, p. 417-420, 2005.

QUEIROZ, D. A.; et al. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. **Braz J Med Biol Res**, v.35, n. 10, p. 1183-93. Oct, 2002.

RANGANATHAN, S.C.; SONNAPPA, S. Pneumonia and Other Respiratory Infections. Pediatric Clinics of North America. v. 56, n. 1, p. 135-156. Fev, 2009.

REED, S.E. The etiology and epidemiology of common cold, and the possibilities of prevention. **Clin.Otolaryngol**.v. 6, p. 379-87, 1981

REIS, A. D., et al. Comparison of direct immunofluorescent, conventional cell culture and polymerase chain reaction techniques for detecting respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates from infants. **Rev Inst Méd Trop**. v. 50, n. 1, p. 37-40, 2008.

RODRIGUES, O. G.; ROZOV, T. Infecções virais em crianças portadoras de doença respiratória aguda, atendidas em um Centro de Saúde Escola, em Belém, Pará, Brasil. **Pediatria (São Paulo)**, v. 26, n. 1, p. 13-20, 2004.

ROSSMAN, M.G.; ARNOLD, E.; ERICKSSON, J.W. The structure of a human common cold virus (rhinovirus 14) and its functional relations to other picornaviruses. **Nature**, 317 p. 145-153, 1985

SANGARÉ, L., et al. Hospitalization for Respiratory Syncytial virus among California Infants: Disparities related to race, insurance, and geography. **The Journal of Pediatrics**. p. 373-77, Sep, 2006.

SANTANNA, C.C.; DELI, C. Bronquiolite. In: YEHUDA BENGUIGUI, F.J.L. Infecções respiratórias em crianças. **Organização Mundial de Saúde**. Washington. p.264-81. 1998

SHAY, D.K.; et al. Bronchiolitis Associated Hospitalizations Among US children, 1980-1986. **Jama**, v. 282, n. 15, p. 1440-46, 1999.

SHEK, L. P. e LEE, B. W. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. **Paediatr Respir Rev**, v. 4, n. 2, p. 105-11, Jun, 2003.

SIGN. Bronchiolitis in children. A national clinical guideline. Disponível em: <http://www.sign.ac.uk>. 2006. Acesso em 23 junho.2010.

SOMECH, R.; et al. Epidemiologic, socioeconomic, and clinical factors associated with severity of respiratory syncytial virus infection in previously healthy infants. **Clin Pediatr (Phila)**, v. 45, n. 7, p. 621-7, Sep, 2006.

SOUZA, L.S.; et al. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban Northeast Brazil. **Pediatr Pulmonol**, 35, p. 184-91, 2003.

SPENCER, M.J.; CHERRY, J.D. A denoviral Infections. In: FEIGIN, R.D.; CHERRY, J.D. ed. **Textbook of pediatric infectious diseases**, ed 2, p. 1688-708, 1987.

STOCKTON, J., et al. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. **J Clin Microbiol**, 36, 2990-5.1998.

STRALIOTTO, S. M.; et al. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 4, p. 283-91, Jul-Aug 2002.

SYRMIS, M.W., et al. A sensitive, specific, and costeffective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. **J Mol Diag**. n v.6, p. 25-131, 2004.

TAPPAREL, C., et al. Pneumonia and pericarditis in a child with HRV-C infection: a case report. **J Clin Virol**, v. 45, p. 157-60, 2009.

THOMAZELLI, L M.; et al. Vigilância de oito vírus respiratórios em amostras clínicas de pacientes pediátricos no sudeste do Brasil. **J. Pediatr. (Rio J.)**, Porto Alegre, v. 83, n. 5, out. 2007.

THOMPSON, W. W.; et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. **Jama**, v. 289, n. 2, Jan 8, p. 179-86, 2003.

TYRRELL, D. What's new on the common cold. *Practitioner*. v. 234, p. 391-95, 1990.

TSUCHIYA, L. R.; et al. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. **J Infect**, v. 51, n. 5, p. 401-7, Dec, 2005.

VAN BENTEN., et al. Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. **Pediatric Allergy and Immunology**.v. 14, p. 363-370, 2003.

VAN DER HOEK, L., et al. Human coronavirus NL63 infection is associated with croup. **Adv Exp Med Biol**, v. 581, p. 485–91, 2006.

VAN DER ZALM, M.M.; et al. Respiratory Pathogens in children with and without Respiratory Symptoms. **J.Pediatr**, v.154, p. 396-400, Mar, 2009a.

_____. Respiratory Pathogens in Respiratory Tract Illnesses During the first years of live. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 28, n. 6, p. 472-76, Jun 2009b.

VAN EWIJK, B.E.; et al. Prevalence and impact of respiratory viral infections in young children with cystic fibrosis prospective cohort study. **Pediatrics**, v. 122, n. 6, p.1171-6, 2008.

VIEIRA, S.E.;et al. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Méd Trop São Paulo**, v. 43, n. 3, p. 125-31, 2001.

WEBER, M.W.; MULHOLLAND E.K.; GREENWOOD, B.M. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. **Trop Med Int Health**, 3, p.268-80, 1998.

WEISSENBACKER, M.C. and AVILA, M.M. Os vírus como causa de IRA alta e baixa em crianças: Características gerais e diagnóstico. In: YEHUDA BENGUIGUI, F.J.L. Infecções respiratórias em crianças. **Organização Mundial de Saúde**. Washington. p. 91-108, 1998.

WHITEHEAD, S. S.; et al. Replacement of the F and G proteins of respiratory syncytial virus (RSV) subgroup A with those of subgroup B generates chimeric live attenuated RSV subgroup B vaccine candidates. **Journal of Virology**, v. 73, p. 9773-9780, 1999.

WILLIAMS, B.G.; et al. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. **Lancet Infect Dis**, 2, p. 25-32, 2002.

WILLIAMS J, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. **N Engl J Med** v. 350, p. 443–50, 2004.

WOHL, M.E.B. Bronchiolitis. In: KENDIG's Disorders of the respiratory tract in children. **Chernick**, Ed. 5a., Philadelphia, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Acute Respiratory Infections (Update September 2009). Disponível em http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en. Acesso em 23 de junho 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.(WHO) Changing history. Geneva, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Case management of acute respiratory infections in developing countries report of a working group meeting .WHO: Geneva, Document WHO/RSD/85. 15 Rev 1, 44 p., 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses, v. 70, n. 6, p.699-703, 1992

WU, W.; TANG, Y.W. Emerging Molecular Assays for Detection and Characterization of Respiratory Viruses. **Clin, Lab. Med.**v. 29, p. 673-693, 2009.

XU, Z.; et al. Potent inhibition of respiratory syncytial virus by combination treatment with 2-5A antisense and ribavirin. **Antiviral Res**, v. 61, n. 3, p. 195-206, 2004.

YOSHIDA, L.M.; et al. Viral Pathogens associated with acute respiratory infections in central Vietnamese children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 29, n. 1, Jan, 2010.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Vírus respiratórios em crianças atendidas em serviços públicos de atenção primária e secundária à saúde de 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 Dra. Divina A. O. Queiróz e Dr. Hélio L. Silveira e colaboração de Thelma F.M.S. Oliveira, Lourenço F. Costa, Nayhanne T. de Paula, Tatiany Calegari, Paulo Guilherme G. Ribeiro e Poliana C. R. Bonati 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.

A coleta será realizada após o consentimento expresso dos pais ou responsáveis, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, constituído de duas cópias, uma pertencente ao pai ou responsável pelo sujeito da pesquisa e outra que será arquivada no Laboratório de Virologia. Essas amostras serão coletadas pelas enfermeiras Tatiany ou Poliana, 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.

Para a criança, sujeito da pesquisa, não há previsão de que ocorra qualquer tipo de risco, complicação e/ou intercorrência ao longo do desenvolvimento do presente estudo. Os benefícios serão relativos à descoberta do agente causador da doença, que auxiliará o médico no tratamento e também para a obtenção conhecimento científico.

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

Profa. Dra. Divina A.O. Queiróz

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

ANEXO A



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: cep@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 025/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO
 CEP/UFU 390/08

Projeto Pesquisa: Circulação de vírus respiratórios em crianças atendidas em serviço de saúde pública de Uberlândia - MG

Pesquisador Responsável: Divina Aparecida de Oliveira Queiróz.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do relatório final: Dezembro de 2009.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 17 de fevereiro de 09.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
 Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.a), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatorio do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.a). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

ANEXO C

Idade meses	Gênero	Local	Diagnóstico	IFI	RT-PCR	febre	coriza	tosse	dispneia	sibilancia	Alt Rx			hospit.	coleta mês/ano
											Hiperins	Infiltra.int.	Infilt.alveo		
16	M	UAI	Traqueobronquite	-	HRV	x		x							02-08
59	F	UAI	Resfriado com	-	HRV	x	x	x							02-08
14	F	UAI	Resfriado com	PIV	-	x	x	x							02-08
41	F	UBSF	Resfriado com	-	HRV e VRS	x	x	x							03-08
12	M	UBSF	Resfriado com	VRS	VRS	x	x	x							04-08
12	M	UAI	Pneumonia	VRS	VRS	x	x	x	x	x					04-08
29	M	UBSF	Resfriado com	-	-	x	x								05-08
24	F	UBSF	Resfriado com	-	HRV	x	x	x							06-08
9	M	UBSF	Resfriado com	-	-	x	x	x							12-08
9	M	UBSF	Resfriado com	-	HRV	x	x	x							02-09
16	M	UBSF	Resfriado com	-	-	x	x	x							03-09
15	F	UAI	Traqueobronquite	-	-	x	x	x	x						03-09
22	F	UAI	Traqueobronquite	-	VRS	x	x	x	x	x			x		04-09
20	M	UAI	Resfriado com	-	-	x	x	x							04-09
28	M	UAI	Resfriado com	-	-	x	x	x							04-09
38	M	UBSF	Resfriado com	-	-		x	x							04-09
4	M	UAI	Resfriado com	FLU	-	x	x	x							04-09
38	F	UAI	Resfriado com	-	-			x							05-09
2	M	UBSF	Resfriado com	VRS	-			x							05-09
5	F	UBSF	Resfriado com	VRS	-		x	x							05-09
42	M	UBSF	Resfriado com	-	HRV e VRS e Adv	x	x	x							05-09
15	F	UAI	Pneumonia	VRS	-	x	x	x	x	x			x	x	05-09
2	M	UBSF	Resfriado com	-	-	x	x	x							06-09
58	F	UBSF	Resfriado com	-	-	x	x	x							06-09
3	F	UBSF	Resfriado com	-	-		x	x							06-09
20	M	UBSF	Resfriado com	-	HRV		x	x							07-09
3	F	UBSF	Resfriado com	-	-		x	x							07-09
21	F	UBSF	Resfriado com	-	-		x	x							08-09
36	F	D. Bosco	Pneumonia	-	-	x		x	x	x	x	x		x	11-09
4	F	D. Bosco	Bronquiolite	-	HRV	x		x	x	x	x	x		x	11-09
24	F	D. Bosco	Pneumonia	PIV	-	x		x	x	x	x	x		x	11-09
8	M	D. Bosco	Pneumonia	-	-	x	x	x	x	x	x		x	x	11-09
21	M	D. Bosco	Pneumonia	-	HRV e Adv	x		x	x	x		x		x	11-09
2	F	D. Bosco	Pneumonia	PIV	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	01-10
5	M	D. Bosco	Bronquiolite	-	-	x		x	x	x	x	x		x	01-10
6	M	D. Bosco	Pneumonia	-	VRS	x		x	x	x		x		x	01-10
6	F	D. Bosco	Bronquiolite	-	-	x		x	x	x	x	x		x	01-10
7	F	D. Bosco	Pneumonia	-	-	x	x	x	x	x	x	x		x	01-10
20	M	D. Bosco	Pneumonia	-	VRS	x	x	x	x	x	x	x	x	x	02-10
5	M	D. Bosco	Pneumonia	-	-	x		x	x	x		x		x	05-10
59	M	D. Bosco	Traqueobronquite	-	HRV			x	x	x				x	05-10
3	F	D. Bosco	Pneumonia	-	-	x		x	x	x		x		x	05-10
5	M	D. Bosco	Bronquiolite	-	-	x		x	x	x	x			x	05-10