

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

**VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS DE IDADE,
COM DOENÇA RESPIRATÓRIA AGUDA, EM UBERLÂNDIA, MG, NO PERÍODO
DE 2001 A 2004**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como parte de obtenção do título de
Mestre

Laurenço Faria Costa

Uberlândia, MG

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

**VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS DE IDADE,
COM DOENÇA RESPIRATÓRIA AGUDA, EM UBERLÂNDIA, MG, NO PERÍODO
DE 2001 A 2004**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como parte de obtenção do título de
Mestre

Laurenço Faria Costa
Orientadora: Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz

Uberlândia, MG
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como parte de obtenção do título de
Mestre

Lourenço Faria Costa
Orientadora: Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz

Uberlândia, MG
2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora, Divina, que vem contribuindo ao longo desses anos para meu amadurecimento tanto científico quanto pessoal.

Agradeço a todos os colegas de curso, em especial ao meu amigo Jean. Aos funcionários do PPIPA, em especial ao Neto, bem como a todos os professores do programa. Agradeço também à UFU, ao ICBIM, FAPEMIG, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro e estrutural.

Agradeço aos membros da banca, Dra. Divina Cardoso e Dra. Valéria Bonetti.

Agradeço a todos do Laboratório de Virologia: Ludmila, Bruno, Lucas, Guilherme, Lysa, Renata, Gabriela e em especial Thelma, pelo compartilhamento do aprendizado e pelo companheirismo, pois nosso ambiente de trabalho é o mais altruísta e amigável que existe.

Agradeço também à minha família: meus pais Heli e Joana e meus irmãos Léo e Lu, pois grande parte de meus êxitos se deve a minha formação familiar, baseada em princípios de caráter e honestidade.

Agradeço a meus familiares, em especial a minha tia Eni e a minha vó Alice, as quais considero como mães.

Agradeço a minha namorada, companheira e esposa Marcela, entre tantas outras coisas pela dedicação, carinho e cumplicidade, pois a seu lado nunca me senti desamparado.

Agradeço a todos meus verdadeiros amigos, dentre os quais cito: Jean Carlos, Renata, Sérgio, Marquinho, Tininha, Dany Pan, Jonas e Everton.

Talvez não tenha colocado todo mundo que precisasse, mas o que importa é que todos contribuíram de uma forma ou de outra, para meu êxito. Com isso, venho aprendendo cada vez mais que um indivíduo não se faz por si só.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução.....	11
2. Objetivos.....	19
3. Material e métodos.....	20
3.1. Uberlândia, MG.....	20
3.2. Hospital de Clínicas e pacientes.....	20
3.3. Coleta e processamento das amostras.....	21
3.4. Reação de IFI para detecção de sete vírus respiratórios.....	22
3.5. Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para detecção do rinovírus.....	22
3.6. Análise estatística.....	23
4. Resultados.....	24
5. Discussão.....	30
6. Conclusões.....	36
7. Referências bibliográficas.....	37

Lista de Abreviaturas

AdV – adenovírus

ANF – aspirado de nasofaringe

DRA – doença respiratória aguda

ENF-Ped – enfermaria pediátrica

FLU – influenzavírus

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

HRV – rinovírus humano

IFI – imunofluorescência indireta

IRA – infecção respiratória aguda

ITRI – infecção do trato respiratório inferior

ITRS – infecção do trato respiratório superior

PAP – pronto atendimento pediátrico

PIV – parainfluenzavírus

PS-Ped – pronto socorro de pediatria

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

TBE – tris-Borate-ethylenedianinetetracetic acid

UTI-Neo – unidade de terapia intensiva neonatal

UTI-Ped – unidade de terapia intensiva pediátrica

VRS – vírus respiratório sincicial

Lista de Figuras

FIGURA 1 – Distribuição percentual dos resultados avaliados pelas técnicas de imunofluorescência indireta e transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase..... 26

FIGURA 2 – Incidência mensal dos vírus respiratórios em crianças menores de cinco anos de idade detectados pelos métodos de imunofluorescência indireta e transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase, em Uberlândia, MG, no período de 2001 a 2004..... 29

Lista de Tabelas

TABELA 1 – Distribuição etária dos casos positivos pelos métodos de imunofluorescência indireta e RT-PCR em Uberlândia, MG, no período de 2001 a 2004. 25

TABELA 2 – Principais quadros clínicos em crianças com doença respiratória aguda de acordo com a idade do paciente e o agente etiológico, no período de 2001 a 2004..... 27

RESUMO

Os vírus mais comumente envolvidos em doenças respiratórias agudas em crianças são os vírus respiratório sincicial (VRS), influenzavírus tipos A e B (FLU A e B), parainfluenzavírus tipos 1, 2 e 3 (PIV-1, -2 e -3), adenovírus (AdV) e os rinovírus (HRV). O objetivo geral do presente estudo foi identificar os principais vírus respiratórios envolvidos em doenças respiratórias aguda (DRA) em crianças de até cinco anos de idade no período de 2001 a 2004. Aspirados de nasofaringe de 379 crianças atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU) com doença respiratória aguda foram coletadas e testadas pelas reações de imunofluorescência indireta (IFI) ou transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O VRS foi detectado em 26,4% (100/379) dessas amostras, FLU tipos A e B em 9,5% (36/379), PIV 1, 2 e 3 em 6,3% (24/379) e AdV em 3,7% (14/379). As amostras negativas e inconclusivas pela IFI (205) foram testadas por RT-PCR para detecção dos HRV, sendo que 26,9% (112/379) foram positivas. Neste estudo, os vírus mais comumente detectados em quadros clínicos de bronquiolite e pneumonia/broncopneumonia em crianças menores de seis meses de idade foram o VRS, respondendo por 40,3% e 34,6% do total de casos, respectivamente, e o HRV, identificado em 25,0% dos casos de bronquiolite e em 15,4% dos casos de pneumonia/broncopneumonia na mesma faixa etária. Relacionado à sazonalidade, a circulação dos vírus identificados predominou nos meses de temperaturas mais baixas. Esse padrão foi evidente para o VRS, que apresentou um pico de ocorrência em abril e maio, enquanto que o pico do FLU e HRV ocorreu em julho. Amostras negativas tanto pela IFI quanto pela RT-PCR indicam que outros patógenos, incluindo coronavírus, metapneumovirus humano além de bactérias, podem ter sido os responsáveis pelas infecções. Finalizando, este estudo foi essencial para um diagnóstico conclusivo de DRAs causadas por vírus, bem como para determinar quais agentes virais circularam nesta região.

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

SUMMARY

The most common viruses involved in acute respiratory diseases among young children are the respiratory syncytial virus (RSV), influenzavirus (FLU), parainfluenzavirus (PIV), adenovirus (AdV) and human rhinovirus (HRV). The purpose of the present study was to identify the main respiratory viruses that affected children younger than five years old in Uberlândia, in Midwestern Brazil. Nasopharyngeal aspirates from 379 children attended at Hospital de Clínicas (HC/UFU), from 2001 to 2004, with acute respiratory disease, were collected and tested by either immunofluorescence assay (IFA) or reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR). RSV was detected in 26.4% (100/379) of samples, FLU A and B in 9.5% (36/379), PIV 1, 2 and 3 in 6.3% (24/379) and AdV in 3.7% (14/379). Negative and indeterminate samples (205) by IFA were tested by RT-PCR for detection of HRV, and 29.6% (112/379) was positive. RSV, particularly among children in their first 6 months of life, and HRV cases showed highest incidence. For both virus, bronchiolitis and pneumonia/bronchopneumonia were the main nosological presentation among children less than 6 months, were RSV responded for 40,3% and 34,6% of the cases, respectively, and the HRV were detected in 25,0% of bronchiolitis cases and 15,4% of pneumonia/bronchopneumonia cases at the same referred age group. Negative samples by both IFA and RT-PCR might be indicative that other pathogens, such as coronavirus, human metapneumovirus and bacteria, could be the causative agent in these infections. Laboratorial diagnosis constituted an essential instrument to determine the incidence of the most common viruses in respiratory infections among young children in this region.

Key words: respiratory viruses, respiratory disease, immunofluorescence assay, reverse transcription-polymerase chain reaction, children

1. INTRODUÇÃO

Os agentes virais são as mais freqüentes causas de infecções respiratórias agudas (IRAs), tendo como resultado perda de dias de trabalho e de escola (DENNY, 1995; LANGLEY et al., 1997) e consequentemente, perdas de ordem econômica (BIRNBAUM et al., 2002). Dessa forma, o impacto causado pelas doenças respiratórias em países em desenvolvimento é significativamente maior em comparação ao descrito para países desenvolvidos (FISCHER et al., 2002; LAW et al., 2002), onde aspectos sócio-econômicos provavelmente são relevantes para aumento do risco de infecções respiratórias para todas as faixas etárias (HAWKER et al., 2003).

Particularmente em crianças menores de cinco anos de idade, as IRAs envolvendo o trato respiratório inferior são responsáveis por uma porcentagem estimada de mortalidade infantil de até 5% em países desenvolvidos, como EUA, Canadá e países europeus, a uma faixa de 15-25% em alguns países da África, América do Sul e Sudeste da Ásia (WILLIAMS et al., 2002). Quanto à morbidade, infecções virais são consideradas como importantes causas de danos no trato respiratório de crianças, respondendo por elevados índices de hospitalizações (COUNIHAN et al., 2001; TSUCHIYA et al., 2005) e podendo desencadear doenças atópicas como a asma (GERN et al., 2005).

Particularmente no Brasil, alguns estudos realizados em diferentes áreas geográficas, têm revelado os agentes virais como a principal causa de IRAs, principalmente em crianças, como demonstrado nas cidades de Fortaleza (ARRUDA et al., 1991), Rio de Janeiro (NASCIMENTO et al., 1991), São Paulo (MIYAO et al., 1999; VIEIRA et al., 2001) e Curitiba (TSUCHIYA et al., 2005).

Alguns fatores referentes ao hospedeiro, ao meio-ambiente e ao próprio agente infeccioso têm sido relevantes na incidência de infecções respiratórias causadas por vírus

(SIMOES, 2003; AVENDAÑO et al., 2003; HAWKER et al., 2003). Referente ao hospedeiro, alguns relatos têm incluído a tenra idade como um dos principais responsáveis pela gravidade e/ou elevada frequência das IRAs, onde a incidência das doenças respiratórias causadas por vírus decrescem com o avanço da idade (SHEK, LEE, 2003; ZAMORANO et al., 2003), exceto para os idosos (TREANOR, FALSEY, 1999). Em adição, doença congênita cardíaca, baixa idade gestacional e múltiplas gestações também têm se mostrado relevantes (RESCH et al., 2005).

Referente aos aspectos ambientais, determinadas condições climáticas estão relacionadas a surtos de doenças respiratórias causadas por vírus. De fato, alguns vírus respiratórios são responsáveis por surtos epidêmicos anuais com ocorrências sazonais específicas (MIYAO et al., 1999; MONTÓ, 2002; STENSBALLE et al., 2003), demonstrando ainda diferenciados padrões epidemiológicos em países temperados (MONTÓ, 2002) e em regiões tropicais (SHEK, LEE, 2003). Ainda com relação a aspectos ambientais, diversos fatores têm aparentemente contribuído para a emergência e re-emergência de várias doenças, incluindo as respiratórias (FELDMANN et al., 2002; McMICHAEL, 2004; MORENS et al., 2004), onde menciona-se entre eles a poluição ambiental (ESTRELLA et al., 2005).

Neste contexto do hospedeiro e do ambiente, alguns agentes virais recém identificados e re-emergentes, vêm sendo descritos como importantes causadores de doenças respiratórias nos últimos anos: o metapneumovírus humano (hMPV) (HOOGEN et al., 2001), apontado como um dos principais agentes causadores de doença respiratória em crianças (KUIKEN et al., 2003); um coronavírus humano, causador da síndrome respiratória aguda severa (SARS) e cuja origem se baseia em uma relação de proximidade entre o homem e outros animais (BELL et al., 2004); e determinadas cepas dos influenzavirus (FLU), particularmente a H5N1 aviária, causadora da gripe asiática, onde é atribuído a este agente a possibilidade de

ocasionar um surto pandêmico, caso a transmissão deste vírus de pessoa a pessoa se torne possível (BARRERA, REYES-TERÁN, 2005).

Há muito, porém, outros agentes virais vem se destacando como importantes causas de IRAs em todo mundo. São eles: vírus respiratório sincicial (VRS), parainfluenzavírus (PIV), adenovírus (AdV) e rinovírus (HRV) (MIYAO et al., 1999; LIN et al., 2003; MACKIE, 2003; VIEGAS et al., 2004; TSUCHIYA et al., 2005).

O VRS, primeiramente isolado em 1956 e inicialmente identificado como um patógeno de coriza em chipanzés é um membro da família *Paramyxoviridae*, gênero *Pneumovírus*, sendo um vírus envelopado do tipo RNA de fita simples e com polaridade negativa. O genoma do vírus é traduzido em 11 proteínas: quatro proteínas do nucleocapsídeo (N, P, L e M2-1); três glicoproteínas do envelope (G, F e SH); duas proteínas não-estruturais (NS1 e NS2); uma de matriz (M); e um fator regulatório de RNA (M2-2) (WHITEHEAD et al., 1999).

O VRS é a principal causa de doença respiratória grave do tipo bronquiolite com chiado e pneumonia (IMAZ et al., 2000; BAUMEISTER et al., 2003; FONSECA, GRISI, 2003; CALEGARI et al., 2005), ocasionando um aumento no número de hospitalizações (TSUCHIYA et al., 2005) em crianças em todo mundo (MIYAO et al., 1999; SHEK, LEE, 2003; VIEGAS et al., 2004), e sendo particularmente grave para aquelas nos primeiros seis meses de vida (LAW et al., 2002; QUEIRÓZ et al., 2002; SIMOES, 2003; MOURA et al., 2003) quando ainda há circulação de anticorpos maternos. Ainda, determinados fatores de risco, tais como prematuridade, exposição à fumaça de cigarro, aglomerados humanos, nascimentos em períodos de maior circulação do VRS entre outros, são relevantes para um aumento da gravidade e frequência de infecções causadas por esses vírus (AUJARD, FAUROUX, 2002).

A reatividade do vírus com anticorpos monoclonais (MAbs) contra as proteínas G e F e a confirmação através de análises de sequência da proteína G, possibilitaram o reconhecimento de dois subgrupos antigênicos do vírus, o “A” e o “B”, onde o subgrupo “A” apresenta uma maior variabilidade de genótipos em relação ao “B” (VENTER et al., 2001). Esses subgrupos apresentam padrão epidemiológico complexo em termos de circulação e manifestação clínica. Porém, alguns trabalhos epidemiológico-moleculares mencionados a seguir, vêm elucidando esse aspecto.

A co-circulação dos dois subgrupos e de subtipos de cada subgrupo pode ocorrer em um mesmo surto epidêmico (VENTER et al., 2001; CINTRA et al., 2001; SATO et al., 2005), embora alguns estudos (MOURA et al., 2003; MENTEL et al., 2005) tenham relatado uma predominância do VRS “A” em relação ao subgrupo “B”. De qualquer forma, é relatada uma alternância entre os subgrupos “A” e “B” em sucessivos surtos (STRALIOTTO et al., 2001; SATO et al., 2005). Esta alternância pode estar vinculada a pressões imunológicas, pois modificações sequenciais da proteína G são relatadas em uma mesma área geográfica ao longo de diversos surtos epidêmicos do VRS tipo “A” (CHOI, LEE, 2000).

Relacionado às manifestações clínicas, infecções pelo VRS do subgrupo “A” são tidas como mais severas em relação ao “B” (PAPADOPOULOS et al., 2004). Por outro lado, alguns estudos (CINTRA et al., 2001; MARTINELLO et al., 2002; DEVINCENZO, 2004) não relataram diferença quanto à gravidade entre as infecções pelo VRS “A” e “B”.

Os influenzavírus (FLU), membros da família *orthomyxoviridae*, são um importante problema de saúde pública em todo mundo (COX, SUBBARAO, 2000), onde crianças constituem o grupo etário mais afetado (NEUZIL et al., 2002). Apesar de infecções por esses vírus poderem ser prevenidas por programas efetivos de vacinação (ESPOSITO et al., 2003), tem sido sugerido previsões de pandemias em um futuro próximo (NGUYEN-VAN-TAM,

HAMPSON, 2003; COX et al., 2003), requerendo, dessa forma, o estabelecimento de uma constatação vigilância epidemiológica (LAVANCHY, GAVINIO, 2001).

Esses vírus são divididos em três grupos: influenzavírus tipos “A”, “B” e “C”. Os principais patógenos humanos são os dois primeiros tipos, sendo que o grupo “A” pode ainda ser subdividido em diversos subtipos, baseado na natureza antigênica das glicoproteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA).

Neste sentido, um dos aspectos mais importantes desses vírus refere-se a sua capacidade adaptativa (HOLMES, 2003; MOYA et al., 2004) em decorrência de sua elevada taxa de mutação – “drift” antigênico, e de recombinação genética entre duas cepas distintas – “shift” antigênico, propiciando sua manutenção nos organismos a despeito de diversas pressões imunológicas (FERGUSON et al., 2003).

Assim, surtos epidêmicos ocasionados por esses vírus, em especial os do tipo “A” vêm sendo relatados ao longo das décadas, com constante alternância de cepas, dentre as quais menciona-se: H1N1 causadora da gripe espanhola (1918-1919), cuja estrutura da glicoproteína H1 da referida cepa demonstrou características estruturais primariamente encontradas em cepas aviárias (STEVENS et al., 2004); H2N2 responsável pela gripe asiática (1957), originária de cepas aviárias (KAWAOKA et al., 1989); H3N2 causadora da gripe de Hong-Kong (1968-1969), também originária de cepas aviárias (KAWAOKA et al., 1989), sendo que mudanças em pontos-chaves da sequência do H3 teriam levado ao surgimento de variantes emergentes que possibilitaram sua evasão ao reconhecimento por anticorpos (BOTH et al., 1983); as cepas H5N1 e H9N2 responsáveis por um surto de gripe que se originou em aves em Hong-Kong (1997), onde similaridades de determinadas sequências de genes internos entre as cepas H5N1 e H9N2 sugerem a possibilidade de rearranjo entre estas duas cepas (GUAN et al., 1999).

Recentemente, no ano de 2003 dois surtos foram registrados em Hong-Kong, ocasionados novamente pelas cepas H5N1 e H9N2, e na Holanda ocasionada pela cepa H7N7. Em 2004 foram registrados surtos pela cepa H7N3 no Canadá e H5N1 em alguns países do sudeste asiático, onde aves selvagens contribuiriam para a manutenção e disseminação do vírus para humanos (LI et al., 2004).

A relação de proximidade do homem com outros animais e a elevada capacidade de mutação e rearranjos do genoma viral entre cepas aviárias e humanas tem respondido pelo surgimento de uma cepa acentuadamente patogênica para o homem. Mais recentemente, como já mencionado, têm sido relatados surtos epidêmicos em humanos em países do sudeste asiático e na Turquia ocasionados pela cepa aviária H5N1 (BARRERA, REYES-TERÁN, 2005), re-emergindo após um surto no sudeste da Ásia em 1997 (CLAAS et al., 1998).

Os parainfluenzavírus, pertencentes à família *paramyxoviridae*, apresentam quatro tipos, sendo que os tipos 1 e 3 pertencem ao gênero *Paramyxovirinae*, e os tipos 2 e 4a e 4b são agrupados no gênero *Rubulavirus*, sendo que eles apresentam padrões clínicos-epidemiológicos distintos. Entretanto, de modo geral, esses vírus aparentemente exibem um padrão de ocorrência sazonal (MONTÓ, 2002), sendo considerado uma importante causa de doença respiratória em crianças jovens (KIM et al., 2000; MONTÓ, 2002; SHEK, LEE, 2003; VIEGAS et al., 2004), idosos e indivíduos imunocomprometidos (TREANOR, FALSEY, 1999; MADDEN et al., 2004). Em adição, esses vírus são tidos como importantes causas de hospitalizações em crianças menores de cinco anos de idade (COUNIHAN et al., 2001).

Infecções por adenovírus são comuns em todas as idades, causando epidemias adquiridas tanto em hospitais quanto na comunidade (LIN et al., 2003) e sendo detectados em todos os meses do ano (LARRAÑAGA et al., 2000). Em adição, os adenovírus têm sido associados a hospitalizações de pacientes asmáticos (TAN et al., 2003) e com casos de otite média aguda em crianças menores de 2 anos de idade (MONOBE et al., 2003).

Mais de 50 sorotipos dos adenovírus já foram identificados como causadores de uma ampla gama de síndromes clínicas em humanos. Em decorrência dessa diversidade, a prevalência e a gravidade da doença, especificamente de síndromes respiratórias, relacionada a determinados sorotipos ainda não é bem estabelecida. No entanto, ERDMAN et al. (2002), relataram uma introdução de “novas” variantes da cepa 7 (Ad7d2 e Ad7h) nos EUA e Canadá. Na América do Sul, quadros graves de doenças respiratórias em crianças envolvendo o trato respiratório inferior (TRI) vêm sendo relacionados principalmente à cepa do tipo 7 (Ad7h) (LARRAÑAGA et al., 2000; CARBALLAL et al., 2002), enquanto que na Ásia, casos graves envolvendo o TRI foram relacionados às cepas dos tipos 3 e 7 (HONG et al., 2001). A co-circulação bem como a diversidade genética desses dois sorotipos, além de possíveis trocas de seguimento genômico entre duas cepas (recombinações - “shift”), podem ter contribuído para o caráter epidêmico do vírus, bem como para manifestações severas de doenças respiratórias (KIM et al., 2003).

Os HRV, pertencentes à família *picornaviridae*, são responsáveis pela maioria dos resfriados comuns durante o inverno, causando infecções respiratórias do trato respiratório superior (ARRUDA et al., 1991; SAVOLAINEN et al., 2003), além de ser considerado como fator de risco para otite média aguda (MONOBE et al., 2003). Em adição, os HRV são também responsáveis por casos de doença do trato respiratório inferior em neonatos e crianças com displasia broncopulmonar (CHIDEKEL et al., 1997; GERN, 2002; KOTANIEMI-SYRJÄNEN et al., 2003), contribuindo para exacerbação da asma (MONTTO et al., 2001).

Entre crianças em idade pré-escolar com risco para doenças alérgicas, infecção pelo HRV é considerada por LEMANSKE et al. (2005) como um fator significativo para o chiado e possivelmente, como consequência, o desenvolvimento de asma (KOTANIEMI-SYRJÄNEN et al., 2003).

A informação de que determinados vírus estão causando doença respiratória aguda (DRA) pode ser imprescindível para iniciar uma vigilância clínica-epidemiológica em uma determinada região. Neste aspecto, a investigação laboratorial tem se mostrado necessária para a identificação do patógeno em infecções respiratórias que atingem crianças em Uberlândia e região, tendo em vista três aspectos básicos: i) ainda não havia um estudo em Uberlândia que abordasse esses aspectos; ii) um conhecimento geral sobre as doenças respiratórias em crianças poderia auxiliar em um diagnóstico clínico mais eficaz, levando em consideração o número de prescrições inadequadas baseadas em antibióticos para tratar doenças virais e; iii) a possibilidade, a partir deste estudo, de se elucidar determinadas questões clínicas, principalmente no que diz respeito à gravidade de doenças respiratórias em crianças, dentro de um contexto de co-infecções ou mesmo de identificação de possíveis cepas mais patogênicas do que outras.

Diante do exposto, os métodos de imunofluorescência indireta (IFI) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados para detectar vírus respiratórios em crianças menores de cinco anos de idade com DRA atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

2. OBJETIVOS

1. Detectar os vírus respiratório sincicial, influenzavírus A e B, parainfluenzavírus 1, 2 e 3 e adenovírus pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) em secreção de nasofaringe de crianças atendidas no Hospital de Clínicas / UFU com sintomas de doença respiratória aguda, no período de 2001 a 2004.
2. Detectar os rinovírus pela transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) nas amostras previamente triadas pela IFI, cujos resultados foram negativos ou inconclusivos para os vírus acima referidos.
3. Conhecer aspectos epidemiológicos dos vírus circulantes, em Uberlândia e região, no período de estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Uberlândia, MG

De acordo com o censo de 2000 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Uberlândia é a 3^a maior cidade do Estado de Minas Gerais, com aproximadamente 500 mil habitantes e apresentando uma taxa de crescimento de 3,31% ao ano. O clima é caracterizado por alterações de invernos secos e verões chuvosos, com temperaturas brandas e pouco variáveis (Laboratório de Climatologia e Recursos Hídricos, Instituto de Geografia, UFU).

3.2 - Hospital de Clínicas e pacientes

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU) é um hospital público conveniado com o Sistema Único de Saúde que atende Uberlândia e outras 120 cidades vizinhas, com uma população total estimada de dois milhões de habitantes. Distribuído em unidades de internações, o HC possui uma capacidade máxima de 481 leitos. Em adição, pelo fato de constituir um centro médico de referência regional, a maioria dos leitos é ocupada por pacientes que requerem manipulação de elevada complexidade. Desses leitos, 110 (22,9%) são destinados à admissão infantil: 60 na neonatologia, 41 na enfermaria e 9 na unidade de atendimento intensivo.

Assim, as crianças envolvidas neste estudo foram aquelas atendidas no HC/UFU com quadros clínicos de doença respiratória aguda cujas amostras cínicas foram colhidas até o quinto dia do início dos sintomas. Os pacientes foram atendidos nos seguintes locais do hospital: i) pronto-socorro de pediatria (PS-Ped), ii) pronto atendimento pediátrico (PAP), iii) enfermaria pediátrica (ENF-Ped), iv) unidade de terapia intensiva pediátrica (UTI-Ped) e v) unidade de terapia intensiva neonatal (UTI-Neo). Dados demográficos, tais como idade e sexo, além de sintomas clínicos também foram obtidos no momento da coleta dos espécimes clínicos, através de preenchimento de ficha clínica (ANEXO A). Neste estudo, os seguintes

quadros clínicos foram considerados como principais: bronquiolite, pneumonia/broncopneumonia e infecções do trato respiratório superior (ITRS). Para o último, foi incluído gripe, resfriado e otite média aguda. Sintomas envolvendo o trato respiratório inferior com quadros clínicos de bronquiolite e pneumonia/broncopneumonia foram considerados como grave.

De 2001 a 2004, aspirados de nasofaringe (ANF) de pacientes menores de cinco anos de idade, atendidos com doença respiratória aguda (DRA) no HC/UFU, foram coletados e avaliados para detecção de oito vírus respiratórios. Os métodos de diagnóstico utilizados foram a imunofluorescência indireta (IFI) e a transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

3.3 - Coleta e processamento das amostras

Trezentos e setenta e nove aspirados de nasofaringe (ANF) foram coletados de crianças com quadros clínicos de doença respiratória aguda, de acordo com o que foi descrito por CALEGARI et al. (2005), através da instilação de 0,5mL de soro fisiológico (0,9%) nas narinas de cada paciente, seguido de aspiração por um sistema a vácuo utilizando um cateter, após o consentimento por escrito dos pais ou responsáveis (ANEXO B). O Comitê de Ética em Pesquisa da UFU aprovou o referido procedimento de acordo com a resolução nº. 196/1996/CNS (Conselho Nacional de Saúde). As amostras clínicas foram posteriormente transportadas para o Laboratório de Virologia, onde os espécimes foram processados como previamente descrito (QUEIRÓZ et al., 2002) e estocados em freezers -20°C e -70°C ou em contêineres de nitrogênio líquido.

Os espécimes foram divididos em três alíquotas: i) para reações de IFI, ii) amostras “in natura” para reações de RT-PCR e, iii) para inoculação em cultura de células para fins de estudos futuros.

3.4 - Reação de IFI para detecção de sete vírus respiratórios

As reações de IFI foram conduzidas utilizando uma mistura de anticorpos monoclonais (MAbs) contra sete vírus respiratórios: vírus respiratório sincicial, influenzavírus A e B, parainfluenzavírus 1, 2 e 3 e adenovírus, do “Respiratory Panel I Viral Screening and Identification Kit” (Chemicon International, Inc., Temecula, CA), de acordo com instruções do fabricante. Os kits foram gentilmente cedidos pelo Dr. Dean D. Erdman, do “Respiratory and Enteroviruses Branch” do “Centers for Diseases Control and Prevention” (CDC), Atlanta, GA.

O espécime foi considerado “positivo” para o teste, quando um número >3 células apresentava fluorescência; “negativo” se nenhuma fluorescência era observada e um número ≥ 20 células foram visualizadas; e suspeito se um número <3 células mostrava fluorescência (QUEIRÓZ et al., 2002).

3.5 - Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para detecção do rinovírus

A metodologia de RT-PCR foi aplicada para detectar sequência de RNA do rinovírus (HRV) em amostras que foram negativas ou indeterminadas pela IFI para os sete vírus anteriormente mencionados. O RNA total foi extraído com Trizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), seguindo as instruções do fabricante. Oligonucleotídeos para síntese do DNA complementar (cDNA) e para amplificação por PCR foram descritos por ARRUDA, HAYDEN (1993). Os *primers* “1” (5’GCACTTCTGTTTCCCC), “2” (5’CGGACACCCAAAGTAG) e “4” (5’GCATTCAGGGGCCGGAG) são específicos para picornavírus e o *primer* “3” (5’AGCCTGCGTGGCTGCC), específico para rinovírus. HRV cultivados em cultura de células foi gentilmente cedido pelo Dr. E. Arruda (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo) e utilizado como controle positivo.

Cinco μL do RNA total foi utilizado para sintetizar o cDNA, utilizando-se 40 unidades da transcriptase reversa M-MuLV (Invitrogen), 2 μM do primer 1 HRV-específico (ARRUDA, HAYDEN, 1993) e demais condições sugeridas pelo fabricante, totalizando um volume de 20 μL . Cinco μL do cDNA foram colocados dentro de um tubo para PCR contendo: 0,8 μM dos primers de cada reação da primeira PCR (oligonucleotídeos 1 e 2), 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Roche), 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfatado (Roche) e tampão 1X suplementado com a enzima do fabricante (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl_2 , 50mM KCl, pH 8.3), totalizando um volume de 50 μL . Para a primeira amplificação, foram utilizadas as seguintes condições: 10 minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C e 45 segundos a 72°C, seguido por 5 minutos adicionais a 72°C. Dois μL da primeira amplificação foram pipetados em um tubo para a segunda amplificação. As condições da reação foram as mesmas da primeira reação, exceto no que diz respeito à utilização de *primers* (oligonucleotídeos 3 e 4) da segunda PCR e de 30 ciclos utilizados para a amplificação. Cinco μL dos produtos da segunda reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em TBE (Tris-Borate-ethylenediaminetetraceticacid) 0,5X (SAMBROOK, RUSSELL, 2001), contendo 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídeo. O gel de agarose foi visualizado e fotografado por um sistema digital (ImageMaster VDS, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ).

3.6 - Análise estatística

Análises de diferenças entre proporções foram conduzidas utilizando-se o programa BioEstat versão 3.0 (AYRES et al., 2003). Diferenças entre proporções foram avaliadas pelo teste Qui-quadrado. A incidência dos vírus respiratórios e seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95% foram calculados, onde valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

De 379 amostras de nasofaringe avaliadas pelos métodos de IFI, para detecção do vírus respiratório sincicial (VRS), influenzavírus tipos A e B (FLU A e B), parainfluenzavírus 1, 2 e 3 (PIV 1, 2 e 3) e adenovírus (AdV), e pela RT-PCR para detecção dos rinovírus, foi possível identificar um agente viral em aproximadamente 75% (286/379) dos espécimes (tabela I).

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre as proporções do total de casos ao longo dos grupos etários ($p < 0,05$). Essa diferença foi também observada para os casos positivos para o VRS de acordo com distribuição etária ($p = 0,00$), na qual o grupo correspondente às crianças menores de três meses de idade foi o mais frequentemente afetado (37/100), comparado com outras faixas etárias: 3-6 meses de idade ($p = 0,00$), 6-9 meses ($p = 0,00$), 9-12 ($p = 0,00$), 12-24 ($p = 0,03$) e ≥ 24 meses de idade ($p = 0,00$). Para os HRV, não foi encontrado diferença estatisticamente significativa na distribuição dos casos de acordo com a faixa etária ($p > 0,05$).

Tabela I. Distribuição etária dos casos positivos pelos métodos de imunofluorescência indireta e RT-PCR em Uberlândia, MG, no período de 2001 a 2004

Idade^a	VRS	FLU A	FLU B	PIV 1	PIV 2	PIV 3	AdV	HRV^b	TOTAL
<3	37	2	-	-	-	1	1	19	60
3-6	15	5	-	1	-	1	1	18	41
6-9	12	3	-	-	-	2	2	13	32
9-12	5	2	-	-	1	2	3	13	26
12-24	20	14	1	3	1	3	6	25	73
≥24	11	9	-	3	-	6	1	24	54
Total	100	35	1	7	2	15	14	112	286

^aIdade em meses; ^b Detectados pela RT-PCR em amostras cujos resultados pela IFI foram negativos ou indeterminados

Dos resultados positivos testados pela IFI, o VRS foi o mais frequentemente detectado (26,4% - 100/379), seguido pelos influenzavírus A e B (9,5% - 36/379), parainfluenzavírus 1, 2 e 3 (6,3% - 24/379) e adenovírus (3,7% - 14/379). A detecção dos HRV pela RT-PCR respondeu por 29,5% (112/379) dos casos, enquanto que os resultados negativos ou indeterminados resultou em 24,6% dos casos investigados (figura I).

Não houve diferença de ocorrência entre o VRS e o HRV, os agentes virais mais frequentemente detectados ($p=0,45$).

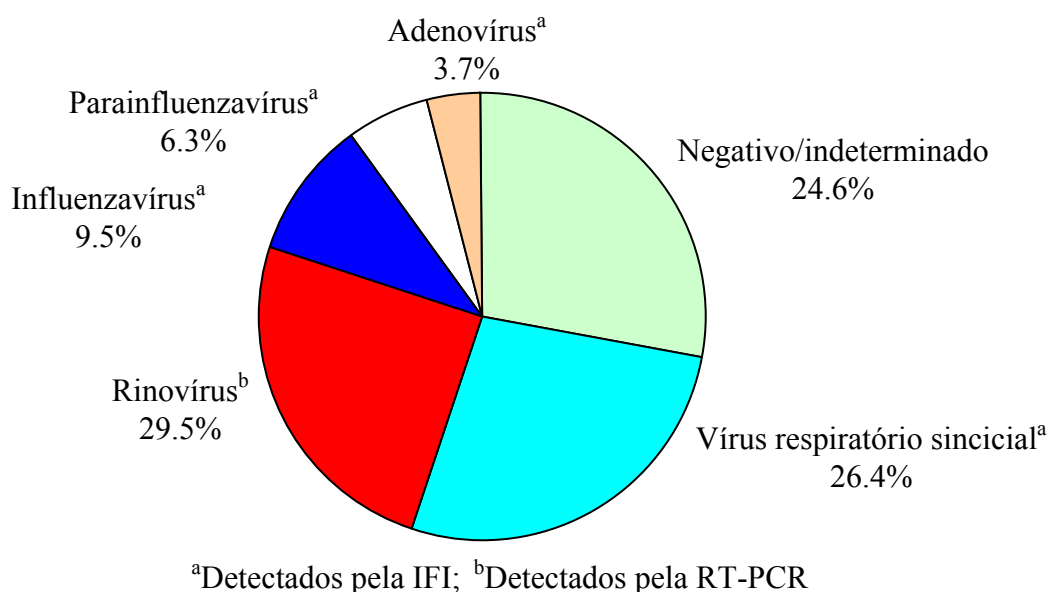


Figura I. Distribuição percentual dos resultados avaliados pelas técnicas de imunofluorescência indireta e transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase

Relacionado à nosologia, os sintomas mais comuns relacionados a infecções causadas pelos HRV, FLU, PIV e AdV foram aqueles envolvendo o trato respiratório superior, principalmente em crianças maiores de 1 ano de idade (tabela II). Por outro lado, infecções pelo VRS foram relacionadas principalmente a casos de bronquiolite e pneumonia/broncopneumonia (doenças do trato respiratório inferior), respondendo por 60% e 46% dos casos, respectivamente. Crianças menores de seis meses de idade foram as mais afetadas por este vírus no que diz respeito aos casos de bronquiolite e pneumonia/broncopneumonia ($p < 0,05$), respondendo por 40,3% e 34,6% do total de casos, respectivamente.

Os PIV e AdV foram relacionados principalmente com sintomas envolvendo o trato respiratório superior (TRS), sendo que 87,5% dos casos de infecção pelos PIV e 61,5% dos casos de AdV ocorreram em casos de infecção do TRS.

HRV foram detectados em 25,0% dos casos de bronquiolite em crianças menores de 6 meses de idade e em 15,4% dos casos de pneumonia/broncopneumonia na mesma faixa etária. Para os influenzavirus, aproximadamente 2/3 (26/36) das infecções por esses vírus envolveram o trato respiratório superior, enquanto que casos de doença do trato respiratório inferior responderam por 11,1% (4/36).

Tabela II. Principais quadros clínicos em crianças com doença respiratória aguda de acordo com a idade do paciente e o agente etiológico, no período de 2001 a 2004

Sintomas Idade^a	Bronquiolite					Pneumonia / BCP					ITRS^b				
	HRV	VRS	FLU	PIV	AdV	HRV	VRS	FLU	PIV	AdV	HRV	VRS	FLU	PIV	AdV
<3	6	22	-	1	-	2	6	-	-	1	3	7	1	-	-
3-6	12	7	1	-	-	2	3	2	-	-	6	3	2	2	1
6-9	2	7	-	-	-	-	-	-	-	1	8	2	2	2	1
9-12	2	4	-	-	2	2	-	-	-	-	4	1	2	1	1
12-24	1	2	1	-	1	3	2	-	1	-	15	10	12	5	4
≥24	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	13	6	7	4	1
Total	23	43	2	1	3	9	12	2	1	2	49	29	26	14	8

^aIdade em meses; BCP – broncopneumonia; ^bITRS – infecções do trato respiratório superior - incluem gripe, resfriado e otite média aguda

Quanto à sazonalidade, os surtos de doenças respiratórias causadas por vírus ocorreram principalmente nos meses de menores temperaturas em Uberlândia (figura II). Casos de infecções causadas pelo VRS foram detectados de fevereiro a junho – final do verão até o final do outono nessa região, com pico de incidência em abril e maio. Em adição, a circulação do VRS mostrou um padrão alternado de incidência, onde nos anos de 2001 e 2003 foram registrados mais casos desses vírus em relação aos anos de 2002 e 2004.

O pico de ocorrência dos FLU ocorreu logo após, no meio do inverno, e se estendeu até o final da estação. Casos de PIV e AdV foram detectados tanto nos meses mais frios quanto nos mais quentes. Resultados similares foram observados para os HRV. Entretanto, para este último, um pico de incidência foi observado durante os meses mais frios, principalmente em junho com 28% (31/112) dos casos.

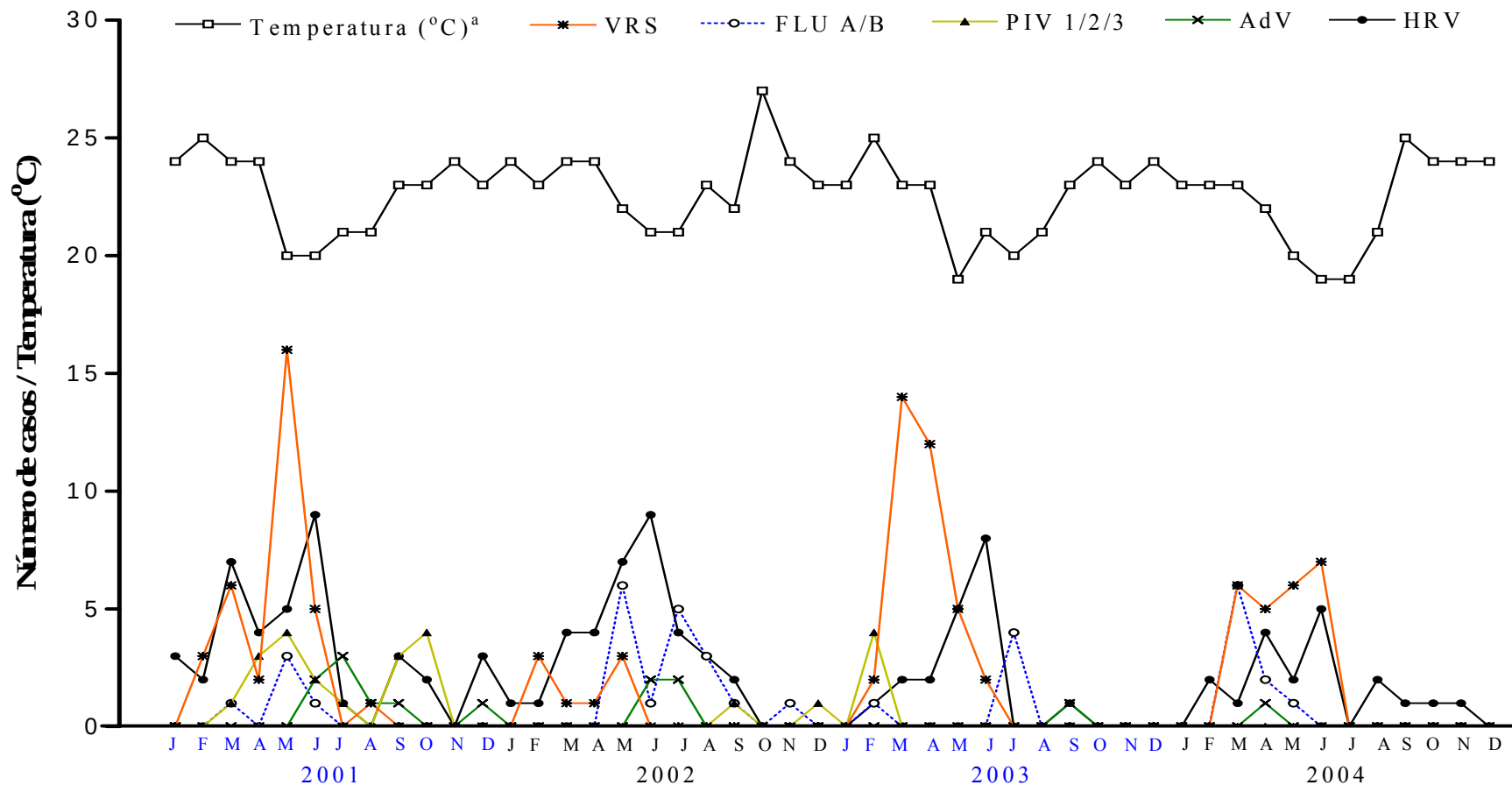


Figura II. Incidência mensal dos vírus respiratórios em crianças menores de cinco anos de idade detectados pelos métodos de imunofluorescência indireta e transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase, em Uberlândia, MG, no período de 2001 a 2004

^aDados do Laboratório de Climatologia e Recursos Hídricos/UFU; VRS – vírus respiratório sincicial; FLU A/B – influenzavírus A e B; PIV 1/2/3 – parainfluenzavírus 1, 2 e 3; AdV – adenovírus; HRV – rinovírus

5. DISCUSSÃO

A aplicação dos testes de imunofluorescência indireta (IFI) e de transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) permitiu a detecção de vírus em 75,5% (286/379) das amostras de secreção de nasofaringe de crianças menores de cinco anos de idade com doença respiratória aguda. Em uma análise retrospectiva de cinco anos utilizando a técnica de IFI, VIEGAS et al. (2004) detectaram um agente viral em 32,8% dos aspirados de nasofaringe de crianças menores de cinco anos de idade com doença do trato respiratório inferior. LIN et al. (2003), utilizando apenas isolamento viral em cultura de células, detectaram pelo menos um agente viral em 40% das amostras clínicas de crianças com doença do trato respiratório superior. MONOBE et al. (2003), em casos de crianças com otite média aguda, identificaram um vírus em 42% das amostras testadas utilizando a técnica de *multiplex nested* RT-PCR. TAN et al. (2003), utilizando a técnica de PCR, identificaram um agente viral em pacientes hospitalizados com asma ou com doença pulmonar crônica obstrutiva em 52% dos espécimes testados.

Particularmente no Brasil, SOUZA et al. (2003), para determinar a incidência de episódios de infecções respiratórias virais em crianças, detectaram um agente viral em 42,8% das amostras testadas utilizando IFA. Ainda, TSUCHIYA et al. (2005) identificaram um agente viral em 30% de amostras de aspirados de nasofaringe ou lavados broncoalveolares utilizando *shell vial culture* e IFA. Dessa forma, os achados do presente estudo indicam a importância de se aplicar pelo menos dois métodos para aumentar a detecção de vírus respiratórios.

A detecção do vírus respiratório sincicial (VRS) pela IFI em mais de 25% das amostras, demonstra que este vírus é um frequente agente causador de doença respiratória em crianças, particularmente em indivíduos nos primeiros seis meses de vida. Alguns estudos

apontam o VRS como uma importante causa de infecção respiratória aguda em crianças menores de cinco anos de idade, comparado com a frequência de outros vírus respiratórios (parainfluenzavírus, adenovírus e influenzavírus), onde a incidência do VRS variou de 20% (IWANE et al., 2004) a 40% (KIM et al., 2000). Ainda, surpreendentemente, VIEGAS et al. (2004) reportaram que o VRS foi o responsável por quase 80% das infecções investigadas pela imunofluorescência indireta em crianças menores de cinco anos de idade com doença do trato respiratório inferior. Particularmente no Brasil, alguns relatos demonstram achados similares, onde a incidência do VRS em diferentes cidades foi: 17% em Salvador (BA) (MOURA et al. 2003), 18% em Botucatu (SP) (BOSSO et al. 2004), 22% em Ribeirão Preto (SP) (CINTRA et al. 2001) e 28% em Vitória (ES) (CHECON et al. 2002).

O achado de que infecções pelo VRS foram associadas principalmente com bronquiolite e pneumonia/broncopneumonia (60% e 46% dos casos, respectivamente), demonstra que este agente é uma importante causa de doença do trato respiratório inferior, como relatado por outros estudos (NASCIMENTO et al., 1991; VIEIRA et al., 2001; MOURA et al., 2003; TSUCHIYA et al., 2005). Em adição, o fato de aproximadamente metade das infecções pelo VRS ter ocorrido em crianças menores de seis meses de idade, reforça achados de que indivíduos nesta faixa etária são as mais propensas a desenvolver doença respiratória por este vírus, apesar da presença de anticorpos maternos (QUEIRÓZ et al., 2002). Ainda nessa mesma faixa etária, foi observada gravidade de infecções por este vírus, pelos casos de bronquiolite e pneumonia/broncopneumonia (40,3% e 34,6% dos casos, respectivamente), também inferindo a vulnerabilidade de crianças nessa idade frente a infecções pelo referido vírus.

A frequência e gravidade de infecções causadas pelo VRS principalmente em crianças menores de seis meses de idade parece ser consequência de eventos complexos e multifatoriais, envolvendo especialmente fatores imunológicos (QUEIRÓZ et al., 2002; OGRA,

2004). Apesar de lactentes serem relativamente imaturos em sua habilidade de elaborar uma resposta imune contra infecções virais, anticorpos maternos parecem desempenhar importante mecanismo de proteção (CROWE, 2001). Entretanto, apesar de alguns estudos sugerirem que lactentes nascidos com elevados níveis de anticorpos maternos neutralizantes anti-VRS desenvolvem doença branda (GLEZEN et al., 1981; OGILVIE et al., 1981), indivíduos nessa faixa etária são os mais afetados pelo VRS (QUEIRÓZ et al., 2002; AUJARD, FAUROUX, 2002; MOURA et al., 2003), conforme observado também no presente estudo. Porém, ainda permanece obscuro se a gravidade da infecção poderia ser desencadeada por uma reação cruzada entre anticorpos maternos VRS subtipos-específicos e diferentes variantes do vírus.

Restrições anatômicas da árvore brônquica também podem contribuir para uma elevação na frequência de infecções pelo VRS em neonatos, mediada pela hiper-reatividade da substância P e seu receptor NK1 nas células-alvo, principalmente na tenra idade (PIEDIMONTE, 2001). Em adição, há uma hipótese de que repetidas infecções respiratórias poderiam induzir a uma maturação imune na criança, diminuindo a gravidade e o número das doenças respiratórias com o aumento da idade (BENTEN et al., 2005).

A detecção dos FLU, PIV e AdV em grupos etários mais velhos, está de acordo com o que foi relatado em outros estudos (KIM et al., 2000; LIN et al., 2003; ERHART et al., 2004). Nesses casos, os anticorpos maternos provavelmente poderiam prover um importante mecanismo de proteção em crianças mais jovens (GLEZEN et al., 1997; CROWE 2001; WOLF et al., 2004).

A detecção dos FLU em 9,5% dos casos indica que esse agente é uma importante causa de doença respiratória em crianças (HEIKKINEN et al., 2004), como relatado por NEUZIL et al. (2002). No entanto, o número de casos positivos para os FLU pode ser aumentado pela aplicação de métodos de diagnósticos baseados na PCR (ELLIS, ZAMBON, 2002). Em relação à nosologia, a maioria das infecções por esse vírus neste estudo foram

relacionados a sintomatologia branda, onde 2/3 dos casos de FLU foram relatados em crianças com doença do trato respiratório superior, enquanto que doenças do trato respiratório inferior foram observadas em 11,1% dos casos. Entretanto, se faz necessário estar atento quanto à emergência de cepas potencialmente pandêmicas que vêm ocorrendo ao longo dos anos (COX, SUBBARAO, 2000), como a cepa H5N1 (BARRERA, REYES-TERÁN, 2005), cujo recente surto epidêmico vem coincidindo com surtos ocasionados pela referida cepa em aves domésticas e selvagens no sudeste da Ásia (GIRARD et al., 2005). No entanto, estudos envolvendo basicamente aspecto epidemiológico-molecular do vírus vêm provendo importantes resultados quanto à elaboração de vacinas eficazes (GIRARD et al., 2005; ARVIN, GREENBERG, 2006).

A detecção dos rinovírus (HRV) em 29,5% dos casos com doença respiratória demonstrou que esses vírus são freqüentes não apenas em adultos, mas também em crianças, como relatado por ARRUDA et al. (1991) e SAVOLAINEN et al. (2003). Apesar de a maioria das infecções pelo HRV ter ocorrido em crianças com doença do trato respiratório superior, como demonstrado por HEIKKINEN, JÄRVINEN (2003), esses vírus foram detectados em 25,0% dos casos de bronquiolite em crianças menores de seis meses de idade e em 15,4% dos casos de pneumonia/broncopneumonia nessa mesma faixa etária, indicando que esses agentes virais poderiam estar envolvidos em quadros mais graves do trato respiratório inferior. Dados similares foram relatados por PAPADOPOULOS et al. (2002) e HAYDEN (2004). Ainda, deve-se considerar co-infecções com outros patógenos (MALCOLM et al., 2001), além de doenças atópicas (não avaliadas) e tenra idade que também poderiam agravar a gravidade da doença onde o HRV esteve presente (HEYMANN et al., 2004; LEMANSKE et al., 2005).

Em relação ao gênero, o presente estudo indicou que meninos foram mais afetados pelos vírus pesquisados do que as meninas (dados não mostrados), em concordância com outros estudos (KIM et al., 2000; MONTÓ, 2002; SHEK, LEE, 2003).

De um modo geral, os vírus respiratórios foram detectados principalmente durante os meses mais frios e secos de Uberlândia, cujo clima é tropical, caracterizado por uma alternância de invernos secos e de verões chuvosos. Os surtos epidêmicos ocasionados pelos vírus respiratórios apresentam um padrão diferenciado, conforme a região estudada (SHEK, LEE, 2003). Em regiões tropicais como Salvador, BA, os vírus respiratórios foram detectados principalmente nas estações chuvosas (MOURA et al., 2003), enquanto que em regiões subtropicais como São Paulo, SP (VIEIRA et al., 2001) e Porto Alegre, RS (STRALLIOTO et al., 2001) os vírus foram detectados durante os meses mais frios, similares aos achados de Uberlândia, MG.

Neste estudo, o VRS foi detectado de fevereiro a junho, com pico de ocorrência em abril e maio (outono), como similarmente relatado em Ribeirão Preto (SP) por CINTRA et al. (2001) e em Vitória (ES) por CHECON et al. (2002), não sendo detectado em outros meses. Em regiões com temperaturas mais frias durante o inverno, em comparação com Uberlândia, como nas cidades de São Paulo (VIEIRA et al., 2001), Botucatu (BOSSO et al., 2004) e Porto Alegre (STRALLIOTO et al., 2001), a circulação do VRS se estendeu até agosto. Um padrão similar foi também observado em Buenos Aires, Argentina (VIEGAS et al., 2004). Assim, aparentemente, a circulação do VRS acompanha baixas temperaturas em locais onde as estações mais frias do ano são relativamente rigorosas. Em adição, a circulação do VRS mostrou um padrão alternado de incidência, sendo que em 2001 e 2003 ocorreram mais casos do VRS em comparação com os anos de 2002 e 2004. Isso aparentemente pode ter sido relacionado a temperaturas mais baixas na cidade nos meses frios dos anos de 2001 e 2003,

em comparação aos anos de 2002 e 2004, conforme registrado pelo Laboratório de Climatologia, Instituto de Geografia, UFU.

A detecção de um pico de circulação dos influenzavírus no mês de maio sugere que esse vírus é mais comumente relacionado aos meses mais frios do ano, o que está de acordo com outros relatos (MONTA, 2002; SHEK, LEE, 2003; VIEGAS et al., 2004). De maneira similar, os HRV foram mais detectados durante os meses que apresentaram temperaturas mais baixas em Uberlândia, em concordância com o que foi relatado por MONTA (2002). Parainfluenzavírus e adenovírus não demonstraram um aparente padrão de circulação sazonal. Para este último vírus, dados similares foram observados por SOUZA et al. (2003).

Estudos adicionais são necessários para elucidar a etiologia dos casos que apresentaram resultados negativos ou indeterminados, podendo indicar a presença de outros patógenos, tais como bactérias, coronavírus (CoV) ou metapneumovírus humano (hMPV), este último sendo considerado uma importante causa de doença respiratória aguda em crianças de até 5 anos de idade (KUIKEN et al., 2003). A não detecção de um vírus nessas amostras pode ainda ser decorrente de dificuldades relacionadas à metodologia, como tempo de coleta e manuseio no processamento e no procedimento da coleta das amostras.

Ainda, a investigação de co-circulação do HRV com outros patógenos, bem como do VRS com hMPV, correlacionando gravidade clínica dentro deste contexto, serão importantes num futuro próximo. Portanto, esforços contínuos são necessários para um melhor entendimento dos padrões de circulação dos vírus identificados, bem como para se iniciar uma consolidação de uma vigilância epidemiológica dos principais vírus respiratórios que atingem crianças em Uberlândia e região.

6. CONCLUSÕES

- Os métodos de IFI e RT-PCR foram imprescindíveis para a detecção de um vírus em aproximadamente 2/3 das amostras clínicas de crianças com sintomas de doença respiratória aguda.
- Os vírus respiratório sincicial (VRS) e rinovírus (HRV) foram os agentes virais mais frequentemente detectados neste estudo, respondendo por 26,4% e 29,5% dos casos, respectivamente.
- Em crianças menores de seis meses de idade o VRS respondeu por 40,3% dos casos de bronquiolite e 34,6% dos casos de pneumonia/broncopneumonia, enquanto que o HRV foi identificado em 25,0% dos casos de bronquiolite e em 15,4% dos casos de pneumonia/broncopneumonia na mesma faixa etária, demonstrando a importância desses agentes virais em casos de doença do trato respiratório inferior em crianças menores de seis meses de idade.
- Os influenzavirus (FLU), parainfluenzavírus (PIV) e adenovírus (AdV) se mostraram importantes agentes causadores de doenças respiratórias, principalmente em crianças mais velhas.
- A sazonalidade do VRS, HRV e FLU se mostrou aparentemente definida, pois esses vírus foram detectados principalmente nos meses mais frios, apesar de que alguns casos de HRV foram registrados também em meses quentes. Já o PIV e AdV não apresentaram um padrão sazonal evidente, sendo detectados tanto nos meses mais frios quanto nos mais quentes do ano.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARRUDA, E.; HAYDEN, F. G.; McAULIFFE, J. F.; SOUSA, M. A.; MOTA, S. B.; McAULIFFE, M. I.; GEIST, F. C.; CARVELHO, E. P.; FERNANDES, M. C.; GUERRANT, R. L.; GWALTNEY, J. M. Jr. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. **Journal of Infectious Disease**, v. 164, p. 252-258, 1991.

ARRUDA, E.; HAYDEN, F. G. Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 7, p. 373-379, 1993.

ARVIN, A. M.; GREENBERG, H. B. New viral vaccines. **Virology**, v. 344, p. 240-249, 2006.

AUJARD, Y.; FAUROUX, B. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection in infants. **Respiratory Medicine**, v. 96, p. S9-S14, 2002.

AVENDAÑO, L. F.; PARRA, J.; PADILLA, C.; PALOMINO, M. A. Impacto en salud infantil del invierno 2002: disociación entre factores ambientales y virus respiratorio sincicial, en Santiago. **Revista Médica de Chile**, v. 131, p. 902-908, 2003.

AYRES, M.; AYRES, M. Jr.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. de A. S. BioEstat – aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas. Versão 3.0, Belém, Pará, Brazil, 2003.

BARRERA, C. A.; REYES-TERÁN, G. Influenza: forecast for a pandemic. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 628-636, 2005.

BAUMEISTER, E. G.; HUNICKEN, D. S.; SAVY, V. L. RSV molecular characterization and specific antibody response in young children with acute lower respiratory infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 27, p. 44-51, 2003.

BELL, D.; ROBERTON, S.; HUNTER, P. R. Animal origins of SARS coronavirus: possible links with the international trade in small carnivores. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, v. 359, p. 1107-1114, 2004.

BENTEN, I. J. van; DRUNEN, C. M. van; KOOPMAN, L. P.; MIDDELKOOP, B. C. van; HOP, W. C. J.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; NEIJENS, H. J.; FOKKENS, W. J. Age- and infection-related maturation of the nasal immune response in 0-2-year-old children. **Allergy**, v. 60, p. 226-232, 2005.

BIRNBAUM, H. G.; MORLEY, M.; GREENBERG, P. E.; COLICE, G. L. Economic Burden of Respiratory Infections in an Employed Population. **Chest**, v. 122, p. 603-611, 2002.

BOSSO, P. A. R.; CANDEIAS, J. M. G.; PADUAN, K. S.; RICCHETTI, S. M. Q.; MIRANDA, A. F. M.; RUGOLO, L. M. S. S.; DURIGON, E. L.; VENTURA, A. M. Human respiratory syncytial virus detection in children admitted at a community hospital in Botucatu, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 348-351, 2004.

BOTH, G. W.; SLEIGH, M. J.; COX, N. J.; KENDAL, A. P. Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. **Journal of Virology**, v. 48, p. 52-60, 1983.

CALEGARI, T.; QUEIRÓZ, D. A. O.; YOKOSAWA, J.; SILVEIRA, H. L.; COSTA, L. F.; OLIVEIRA, T. F. M.; LUIZ, L. N.; OLIVEIRA, R. C.; DINIZ, F. C.; ROSSI, L. M. G.; CARVALHO, C. J.; LIMA, A. C.; MANTESE, O. C. 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.

CARBALLAL, G.; VIDELA, C.; MISIRLIAN, A.; REQUEIJO, P. V.; AGUILAR, M. del C. Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. **BMC Pediatrics**, v. 2, p. 6-12, 2002.

CHECON, R. E.; SIQUEIRA, M. M.; LUGON, A. K.; PORTES, S.; DIETZE, R. Seasonal pattern of respiratory syncytial virus in a region with a tropical climate in southeast Brazil. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 67, p. 490-491, 2002.

CHIDEKEL, A. S.; ROSEN, C. L.; BAZZY, A. R. Rhinovirus infection associated with serious lower respiratory illness in patients with bronchopulmonary dysplasia. **Pediatric Infections Diseases Journal**, v. 16, p. 43 –47, 1997.

CHOI, E. H.; LEE, H. J. Genetic diversity and molecular epidemiology of the G protein of subgroups A and B of respiratory syncytial viruses isolated over 9 consecutive epidemics in Korea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 1547-1556, 2000.

CINTRA, O. A. L.; OWA, M. A.; MACHADO, A. A.; CERVI, M. C.; FIGUEIREDO, L. T. M.; ROCHA, G. M.; SIQUEIRA, M. M.; ARRUDA, E. Occurrence and severity of infections

caused by subgroup A and B respiratory syncytial virus in children in southeast Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 65, p. 408-412, 2001.

CLAAS, E. C. J.; JONG, J. C. de; BEEK, R. van; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, D. M. E. Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection. **Vaccine**, v. 16, p. 977-978, 1998.

COUNIHAN, M. E.; SHAY, D. K.; HOLMAN, R. C.; LOWTHER, S. A.; ANDERSON, L. J. Human parainfluenza virus-associated hospitalizations among children less than five years of age in the United States. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 20, p. 646-653, 2001.

COX, N. J.; SUBBARAO, K. Global epidemiology of influenza: past and present. **Annual Review of Medicine**, v. 51, p. 407-421, 2000.

COX, N. J.; TAMBLYN, S. E.; TAM, T. Influenza pandemic planning. **Vaccine**, v. 21, p. 1801–1803, 2003.

CROWE, J. E. Jr. Influence of maternal antibodies on neonatal immunization against respiratory virus. **Clinical Infectious Disease**, v. 33, p. 1720-1727, 2001.

DENNY, F. W. The clinical impact of human respiratory virus infection. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 152, p. S4-S12, 1995.

DEVINCENZO, J. P. Natural infection of infants with respiratory syncytial virus subgroups A and B: a study of frequency, disease severity, and viral load. **Pediatric Research**, v. 56, p. 914-917, 2004.

ELLIS, J. S.; ZAMBON, M. C. Molecular diagnosis of influenza. **Reviews in Medical Virology**, v. 12, p. 375-389, 2002.

ERDMAN, D. D.; XU, W.; GERBER, S. I.; GRAY, G. C.; SCHNURR, D.; KAJON, A. E.; ANDERSON, L. J. Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 269-277, 2002.

ERHART, L. M.; RANGEL, M. C.; LU, PENG-JUN; SINGLETON, J. A. Prevalence and characteristics of children at increased risk for complications from influenza, United States, 2000. **Journal of Pediatrics**, v. 144, p. 191-195, 2004.

ESPOSITO, S.; MARCHISIO, P.; CAVAGNA, R.; GIRONI, S.; BOSIS, S.; LAMBERTINI, L.; DROGHETTI, R.; PRINCIPI, N. Effectiveness of influenza vaccination of children with recurrent respiratory tract infections in reducing respiratory-related morbidity within the households. **Vaccine**, v. 21, p. 3162–3168, 2003.

ESTRELLA, B.; ESTRELLA, R.; OVIEDO, J.; NARVÁEZ, X.; REYES, M. T.; GUTIÉRREZ, M.; NAUMOVA, E. N. Acute respiratory diseases and carboxyhemoglobin status in school children of Quito, Ecuador. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, p. 607-611, 2005.

FELDMANN, H.; CZUB, M.; JONES, S.; DICK, D.; GARBUTT, M.; GROLLA, M.; ARTSOB, H. Emerging and re-emerging infectious disease. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 191, p. 63-74, 2002.

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

FISCHER, G. B.; TEPER, A.; COLOM, A. J. Acute viral bronchiolitis and its sequelae in developing countries. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 3, p. 298-302, 2002.

FONSECA, C. de B.; GRISI, S. Bronchiolitis, respiratory syncytial virus, and recurrent wheezing: what is the relationship? **Revista do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 58, p. 39-48, 2003.

GERN, J. E. Rhinovirus respiratory infections and asthma. **American Journal of Medicine**, v. 112, p. 19S – 27S, 2002.

GERN, J. E.; ROSENTHAL, L. A.; SORKNESS, R. L.; LEMANSKE, R. F. Effects of viral respiratory infections on lung development and childhood asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, p. 668-674, 2005.

GIRARD, M. P.; CHERIAN, T.; PERVIKOV, Y.; KIENY, M. P. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. **Vaccine**, v. 23, p. 5708-5724, 2005.

GLEZEN, W. P.; PAREDES, A.; ALLISON, J. E.; TABER, L. H.; FRANK, A. L. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. **Journal of Pediatrics**, v. 98, p. 708-715, 1981.

GLEZEN, W. P.; TABER, L. H.; FRANK, A. L.; GRUBER, W. C.; PIEDRA, P. A. Influenza virus infections in infancy. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 16, p. 1065-1068, 1997.

GUAN, Y.; SHORTRIDGE, K. F.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R. G. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: Were they the donors of the “internal” genes of H5N1 viruses in Hong Kong? **Microbiology**, v. 96, p. 9363-9367, 1999.

HAWKER, J. I.; OLOWOKURE, B.; SUFI, F.; WEINBERG, J.; GILL, N.; WILSON, R. C. Social deprivation and hospital admission for respiratory infection: an ecological study. **Respiratory Medicine**, v. 97, p. 1219–1224, 2003.

HAYDEN, F. G. Rhinovirus and the lower respiratory tract. **Reviews in Medical Virology**, v. 14, p. 17-31, 2004.

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

HEIKKINEN, T.; SILVENNOINEN, H.; REUNANEN, T.; ZIEGLER, T.; VAINIONPÄÄ, R. Illness symptoms and absences due to influenza in different age groups of children. **International Congress Series**, v. 1263, p. 101-104, 2004.

HEYMANN, P. W.; CARPER, H. T.; MURPHY, D. D.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; PATRIE, J.; McLAUGHLIN, A. P.; ERWIN, E. A.; SHAKER, M. S.; HELLEMS, M.; PEERZADA, J.; HAYDEN, F. G.; HATLEY, T. K.; CHAMBERLAIN, R. Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, p. 239-247, 2004.

HOLMES, E. C. Molecular clocks and the puzzle of RNA virus origins. **Journal of Virology**, v. 77, p. 3893-3897, 2003.

HONG, JUNG-YUN; LEE, HOAN-JONG; PIEDRA, P. A.; CHOI, EUN-HWA; PARK, KEE-HO; KOH, YOUNG-YULL; KIM, WOO-SUN. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features and prognosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1423-1429, 2001.

HOOGEN, B. G. van den; JONG, J. C. de; GROEN, J.; KUIKEN, T.; GROOT, R. de; FOUCHIER, R. A. M.; OSTERHAUS, D. M. E. A newly discovered human metapneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nature Medicine**, v. 7, p. 719-724, 2001.

IMAZ, M. S.; SEQUEIRA, M. D.; VIDELA, C.; VERONESSI, I.; COCIGLIO, R.; ZERBINI, E.; CARBALLAL, G. Clinical and epidemiologic characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fe, Argentina. **Journal of Medical Virology**, v. 61, p. 76-80, 2000.

IWANE, M. K.; EDWARDS, K. M.; SZILAGYI, P. G.; WALKER, F. J.; GRIFFIN, M. R.; WEINBERG, G. A.; COULEN, C.; POEHLING, K. A.; SHONE, L. P.; BALTER, S.; HALL, C. B.; ERDMAN, D. D.; WOOTEN, K.; SCHWARTZ, B. Population-based surveillance hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus and parainfluenza viruses among young children. **Pediatrics**, v. 113, p. 1758-1764, 2004.

KAWAOKA, Y.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R. G. Avian-to-Human Transmission of the PB1 Gene of Influenza A Viruses in the 1957 and 1968 Pandemics **Journal of Virology**, v. 63, p. 4603-4608, 1989.

KIM, M. R.; LEE, H. R.; LEE, G. M. Epidemiology of Acute Viral Respiratory Tract Infections in Korean Children. **Journal of Infection**, v. 41, p. 152–158, 2000.

KIM, YAE-JEAN; HONG, JUNG-YUN; LEE, HOAN-JONG; SHIN, SEON-HEE; KIM, YUN-KYUNG; INADA, T.; HASHIDO, M.; PIEDRA, P. A. Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4594-4599, 2003.

KOTANIEMI-SYRJÄNEN, A.; VAINIONPÄÄ, R.; REIJONEN, T. M.; WARIS, M.; KORHONEN, K.; KORPPI, M. Rhinovirus-induced wheezing in infancy – the first sign of childhood asthma? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 66–71, 2003.

KUIKEN, T.; FOUCHIER, R.; RIMMELZWAAN, G.; OSTERHAUS, A. Emerging viral infections in a rapidly changing world. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 641-646, 2003.

LANGLEY, J. M.; WANG, E. E. L.; LAW, B. J.; STEPHENS, D.; BOUCHER, F.; DOBSON, S.; McDONALD, J.; MacDONALD, N. E.; MITCHELL, I.; ROBINSON, J. L. Economic evaluation of respiratory syncytial virus infection in Canadian children: A Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study. **The Journal of Pediatrics**, v. 131, p. 113-117, 1997.

LARRAÑAGA, C.; KAJON, A.; VILLAGRA, E.; AVENDAÑO, L. F. Adenovirus surveillance on children hospitalized for acute lower respiratory infections in Chile (1988–1996). **Journal of Medical Virology**, v. 60, p. 342-346, 2000.

LAVANCHY, D.; GAVINIO, P. The importance of global influenza surveillance for the assessment of the impact of the influenza. **International Congress Series**, v. 1219, p. 9-11, 2001.

LAW, B. J.; CARBONELL-ESTRANY, X.; SIMOES, E. A. F. An update on respiratory syncytial virus epidemiology: a developed country perspective. **Respiratory Medicine**, v. 96, p. S1-S7, 2002.

LEMANSKE, R. F. Jr.; JACKSON, D. J.; GANGNON, R. E.; EVANS, M. D.; LI, Z.; SHULT, P. A.; KIRK, C. J.; REISDORF, E.; ROBERG, K. A.; ANDERSON, E. L.; CARLSON-DAKES, K. T.; ADLER, K. J.; GILBERTSON-WHITE, S.; PAPPAS, T. E.; DaSILVA, D. F.; TISLER, C. J.; GERN, J. E. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, p. 571-577, 2005.

LI, K. S.; GUAN, Y.; WANG, J.; SMITH, G. J. D.; XU, K. M.; DUAN, L.; RAHARDJO, A. P.; PUTHAVATHANA, P.; BURANATHAI, C.; NGUYEN, T. D.; ESTOEPANGESTIE, A. T. S.; CHAISINGH, A.; AUEWARAKUL, P.; LONG, H. T.; HANH, N. T. H.; WEBBY, R. J.; POON, L. L. M.; CHEN, H.; SHORTRIDGE, K. F.; YUEN, K. Y.; WEBSTER, R. G.; PEIRIS, J. S. M. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. **Nature**, v. 430, p. 209-213, 2004.

LIN, TZOU-YIEN; HUANG, YHU-CHERING; NING, HSIAO-CHEN; TSAO, KOU-CHIEN. Surveillance of respiratory viral infections among pediatric outpatients in northern Taiwan. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, p. 81-85, 2003.

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

MADDEN, J. F.; BURCHETTE, J. L. Jr.; HALE, L. P. Pathology of parainfluenza virus infection in patients with congenital immunodeficiency syndromes. **Human Pathology**, v. 35, p. 594-603, 2004.

MALCOLM, E.; ARRUDA, E.; HAYDEN, F. G.; KAISER, L. Clinical features of patients with acute respiratory illness and rhinovirus in their bronchoalveolar lavages. **Journal of Clinical Virology**, v. 112, p. 9-16, 2001.

MARTINELLO, R. A.; CHEN, M. D.; WEIBEL, C.; KAHN, J. S. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 839-842, 2002.

McMICHAEL, A. J. Environmental and social influences on emerging infectious diseases: past, present and future. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, v. 359, p. 1049-1058, 2004.

MENTEL, R.; ILGERT, U.; WEGNER, U.; ZIMMERMANN, K.; BRUN, R.; GÜRTLER, L. Molecular and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections in hospitalized children. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 194, p., 67-71, 2005.

MIYAO, C. R.; GILIO, A. E.; VIEIRA, S.; HEIN, N.; PAHL, M. M. C.; BETTA, S. L.; DURIGON, E. L.; STEWIEN, K. E.; QUEIRÓZ, D. A. O.; BOTOSSO, V. F.; GOMES, M. C. S.; LOPES, C. L. B. C.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Infecções virais em crianças internadas por doença aguda do trato respiratório inferior. **Jornal de Pediatria**, v. 75, p. 334-344, 1999.

MONOBE, H.; ISHIBASHI, T.; NOMURA, Y.; SHINOGAMI, M.; YANO, J. Role of respiratory viruses in children with acute otitis media. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 67, p. 801- 806, 2003.

MONTO, A. S.; FENDRICK, N.; SARNES, M. W. Respiratory illness caused by picornavirus infection: a review of clinical outcomes. **Clinical Therapeutics**, v. 23, p. 1615-1627, 2001.

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

MORENS, D. M.; FOLKERS, J. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. **Nature**, v. 430, p. 242-249, 2004.

MOURA, F. E. A.; BORGES, L. C.; PORTES, S. A. R.; RAMOS, E. A. G.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory Syncytial Virus Infections during an Epidemic Period in Salvador, Brazil. Viral Antigenic Group Analysis and Description of Clinical and Epidemiological Aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 739-743, 2003.

MOYA, A.; HOLMES, E. C.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 279-288, 2004.

NASCIMENTO, J. P.; SIQUEIRA, M. M.; SUTMOLLER, F.; KRAWCZUK, M. M.; FARIAS, V.; FERREIRA, V.; RODRIGUES, M. J. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, p. 287-296, 1991.

NEUZIL, K. M.; ZHU, Y.; GRIFFIN, M. R.; EDWARDS, K. M.; THOMPSON, J. M.; TOLLEFFSON, S. J.; WRIGHT, P. F. Burden of interpandemic influenza in children younger than 5 years: a 25-year prospective study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 147-152, 2002.

NGUYEN-VAN-TAM, J. S.; HAMPSON, A. W. The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. **Vaccine**, v. 21, p. 1762–1768, 2003.

OGILVIE, M. M.; VATHENEN, A. S.; RADFORD, M.; CODD, J.; KEY, S. Maternal antibody and respiratory syncytial virus infection in infancy. **Journal of Medical Virology**, v. 7, p. 263-271, 1981.

OGRA, P. L. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 5, p. S119-S126, 2004.

PAPADOPOULOS, N. G.; MOUSTAKI, M.; TSOLIA, M.; BOSSIOS, A.; ASTRA, E.; PREZERAKOU, A.; GOURGIOTIS, D.; KAFETZIS, D. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, p. 1285-1289, 2002.

PAPADOPOULOS, N. G.; GOURGIOTIS, D.; JAVADYAN, A.; BOSSIOS, A.; KALLERGI, K.; PSARRAS, S.; TSOLIA, M. N.; KAFETZIS, D. Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? **Respiratory Medicine**, v. 98, p. 879–882, 2004.

PIEDIMONTE, G. Neural mechanisms of respiratory syncytial virus-induced inflammation and prevention of respiratory syncytial virus sequelae. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v. 163, p. S18-S21, 2001.

QUEIRÓZ, D. A. O.; DURIGON, E. L.; BOTOSO, V. F.; EJZEMBERG, B.; VIEIRA, S. E.; MINEO, J. R.; YAMASHITA, C.; HEIN, N.; LOPES, C. L.; CACHARO, A. L.; STEWIEN, K. E. Immune response to respiratory syncytial vírus in young brazilian children. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1183-1193, 2002.

RESCH, B.; PASNOCHT, A.; GUSENLEITNER, W.; MÜLLER, W. Rehospitalisations for respiratory disease and respiratory syncytial virus infection in preterm infants of 29–36 weeks gestational age. **Journal of Infection**, v. 50, p. 397–403, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. 2001.

SATO, M.; SAITO, R.; SAKAI, T.; SANO, Y.; NISHIKAWA, M.; SASAKI, A.; SHOBUGAWA, Y.; GEJYO, F.; SUZUKI, H. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 36–40, 2005.

SAVOLAINEN, C.; BLOMQVIST, S.; HOVI, T. Human rhinoviruses. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 4, p. 91–98, 2003.

SHEK, L. PEI-CHI; LEE, BEE-WAH. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 4, p. 105–111, 2003.

SIMÕES, E. A. F. Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. **Journal of Pediatrics**, v. 143, p. S118-S126, 2003.

SOUZA, L. S. F.; RAMOS, E. A. G.; CARVALHO, F. M.; GUEDES, V. M. C. R.; SOUZA, L. S.; ROCHA, C. M.; SOARES, A. B.; VELLOSO, L. F.; MACEDO, I. S.; MOURA, F. E. A.; SIQUEIRA, M.; FORTES, S.; JESUS, C. C.; SANTIAGO, C. M. G.; CARVALHO, A. M. S.; ARRUDA, E. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban northeast Brazil. **Pediatric Pulmonology**, v. 35, p. 184-191, 2003.

STENSBALLE, L. G.; DEVASUNDARAM, J. K.; SIMOES, E. A. F. Respiratory syncytial virus: the ups and downs of a seasonal virus. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 22, p. S21-S32, 2003.

STEVENS, J.; CORPER, A. L.; BASLER, C. F.; TAUBENBERGER, J. K.; PALESE, P.; WILSON, I. A. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. **Science**, v. 303, p. 1866-1870, 2004.

STRALIOTTO, S. M.; NESTOR, S. M.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory Syncytial Virus Groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 155-158, 2001.

TAN, W. C.; XIANG, X.; QIU, D.; NG, T. P.; LAM, S. F.; HEGELE, R. G. Epidemiology of Respiratory Viruses in Patients Hospitalized with Near-Fatal Asthma, Acute Exacerbations of Asthma, or Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **American Journal of Medicine**, v. 115, p. 272–277, 2003.

TREANOR, J.; FALSEY, A. Respiratory viral infections in the elderly. **Antiviral Research**, v. 44, p. 79–102, 1999.

TSUCHIYA, L. R. R. V.; COSTA, L. M. D.; RABONI, S. M.; NOGUEIRA, M. B.; PEREIRA, L. A.; ROTTA, I.; TAKAHASHI, G. R. A.; COELHO, M.; SIQUEIRA, M. M. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. **Journal of Infection**, v. 51, p. 401-407, 2005.

VENTER, M.; MADHI, S. A.; TIEMESSEN, C. T.; SCHOUB, B. D. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 2117–2124, 2001.

VIEGAS, M.; BARRERO, P. R.; MAFHEY, A. F.; MISTCHENKO, A. S. Respiratory viruses seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina: a five-year analysis. **Journal of Infection**, v. 49, p. 222-228, 2004.

VIEIRA, S. E.; STEWIEN, K. E.; QUEIRÓZ, D. A. O.; DURIGON, E. L.; TOROK, T. J.; ANDERSON, L. J.; MIYAO, C. R.; HEIN, N.; BOTOSSO, V. F.; PAHL, M. M.; GILIO, A. E.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 125-131, 2001.

WHITEHEAD, S. S.; HILL, M. G.; FIRESTONE, C. Y.; CLAIRE, M.; ELKINS, W. R.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. L. 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.; GOUWS, E.; BOSCHI-PINTO, C.; BRYCE, J.; DYE, C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 25–32, 2002.

WOLF, D. G.; REKHTMAN, D.; KEREM, E.; HAY, A.; MADOR, N.; GREENBAUM, E.; DOROZHKO, M.; GREGORY, V.; LIN, Y. P.; ZAKAY-RONES, Z. A summer outbreak of influenza A virus infection among young children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 595-597, 2004.

ZAMORANO, A.; MÁRQUEZ, S.; ARÁNGUIZ, J. L.; BEDREGAL, P.; SÁNCHEZ, I. Relación entre bronquiolitis aguda con factores climáticos y contaminación ambiental. **Revista Médica de Chile**, 131, p. 1117-1122, 2003.

ANEXO A

FICHA CLÍNICA - PROJETO VÍRUS RESPIRATÓRIOS

Atendimento: ____/____/____

Prontuário: _____

Iniciais do nome: _____

Sexo: M F

Data do nascimento: ____/____/____

Duração da gestação: _____ semanas (definir se é pré-termo ou não)

Pais fumantes: sim não Pais atópicos: sim não

Presença de doença de base (descrever qual patologia presente):

Cardiopatia	sim	não
Displasia broncopulmonar	sim	não
Imunodeficiência	sim	não
Outras (definir qual)	sim	não

Descrição sumária do quadro clínico:

Febre (duração):	Dor de garganta	sim	não
Coriza (duração):	Dor no corpo	sim	não
Tosse (duração):	Mal estar	sim	não
Secreção e hiperemia ocular:	Espirros	sim	não

Outros: _____

Frequência respiratória: _____ irpm

Apnéia no P.S. ou durante internação (>20 seg c/ cianose ou bradicardia): sim não

Chiado (sibilos): sim não

Murmúrio vesicular:

Retrações torácicas (tiragens): sim não

Gasometria arterial sat. O₂ em ar ambiente e com O₂

PCO₂

pH

RX de tórax	Hiperinsuflação	sim	não
-------------	-----------------	-----	-----

	Consolidação	sim	não
--	--------------	-----	-----

Atelectasia	sim	não
--------------------	------------	------------

Admissão: ____/____/____	enfermaria	UTI
--------------------------	------------	-----

Ventilação artificial: sim (número de dias:____) não

HD: _____

ANEXO B
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de consentimento livre e esclarecido

Pesquisa de vírus respiratórios e aspectos da resposta imune em espécimes clínicos obtidos de crianças de 0-5 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro, MG

Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Sr. Pais/Responsáveis,

Os vírus respiratórios são os principais agentes causadores de doença respiratória aguda em crianças menores de cinco anos de idade, razão pela qual a equipe de Virologia da UFU vem desenvolvendo pesquisa nesse assunto.

A detecção do agente viral que está 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.

É importante lembrar que a participação neste estudo é voluntária, que o nome de seu filho não será divulgado e que as amostras clínicas não serão utilizadas para nenhum outro estudo.

Se for do seu consentimento a coleta de secreção de nasofaringe (aspirado) e de 2-3mL de sangue de seu filho, favor assinar este documento.

Uberlândia: ____/____/____

Nome do pai/mãe ou responsável: _____

Assinatura: _____

Médicos responsáveis: _____

Profs. Drs. Orlando César Mantese e Hélio Lopes da Silveira

Coordenadora do Projeto:

Profª. Dra. Divina A. O. Queiróz

(34) 3218-2664

Comitê de Ética em Pesquisa da UFU - (34) 3239-4131