Milena De Paulis

**Estudo comparativo das características clínicas
das infecções por um ou mais vírus respiratórios
em lactentes hospitalizados com doença aguda
do aparelho respiratório inferior**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de: Pediatria
Orientadora: Dra. Sandra Elisabete Vieira

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

De Paulis, Milena

Estudo comparativo das características clínicas das infecções por um ou mais vírus respiratórios em lactentes hospitalizados com doença aguda do aparelho respiratório inferior / Milena De Paulis. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientadora: Sandra Elisabete Vieira.

Descritores: 1.Bronquiolite 2.Lactente 3.Sistema respiratório 4.Vírus sinciciais respiratórios 5.Índice de gravidade de doença

USP/FM/DBD-270/10

“ A dúvida é o princípio da sabedoria”

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Acabo de alcançar, através da conclusão dessa dissertação, a primeira conquista da minha vida científica e quero agradecer:

A Deus por me escolher e me capacitar para a arte da vida e da dedicação ao próximo.

À minha mãe Lucia, companheira e incentivadora de todas as horas. Meu porto seguro.

Ao meu pai Remo que sempre valorizou a educação e investiu na minha formação.

Ao meu irmão Fabrizio pelo seu companheirismo e alegria de viver.

À Dra. Beatriz Marcondes Machado (Bia), minha conselheira técnica e sentimental no dia-a-dia e, principalmente, durante o período do meu mestrado.

Ao Dr. João Paulo Becker Lotufo, grande amigo e incentivador científico, permitindo meu afastamento das atividades assistenciais compreendendo a importância dessa etapa.

Ao Dr. Alfredo Elias Gilio, grande mestre (na essência da palavra) e um exemplo de profissional.

À Dra. Sandra Elisabete Vieira que me propiciou a descoberta dos caminhos intrigantes da pesquisa científica.

Aos meus amigos do PA-HU pelo apoio e compreensão nos meus períodos de ausência na assistência e nos meus períodos de angústia científica.

À Dra. Iracema Fernandes (Mamani) que não só me cedeu suas anotações do censo da UTI como fez quase todos os meus plantões, dividindo-os com o Dr. José Carlos Fernandes (Zé), propiciando-me tempo para dedicação ao mestrado.

À equipe de enfermagem do PA-HU, amigas, companheiras e sempre presentes durante todo o meu processo de pesquisa.

À equipe do SAME, em especial à Marli, Eduardo e Deise, profissionais fundamentais para a realização da minha pesquisa. Exemplos de amor e dedicação ao trabalho.

À equipe da Informática, em especial ao Fabiano, que recuperou os dados do meu “pendrive” há quinze dias da entrega do mestrado e ao Ricardo Chida pela sua atenção e paciência na formatação final da dissertação.

Aos meus queridos amigos Flávio Nogueira de Sá, Gabriele Zamperlini Netto, André Pacca Mattar e Luiz Guilherme Florence o meu obrigada infinito por me ajudaram inúmeras vezes em trocas de plantão de última hora para que eu me dedicasse ao mestrado.

Ao amigo. Marcel Liberman que se prontificou a opinar, mesmo com visão de cardiologista, sobre o tema da minha dissertação.

À equipe do Dr. Edison Durigon pelo processamento das amostras e informação dos resultados.

À Patrícia Sacramento pela solidariedade durante todo o processo da coleta de informações.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de gráficos e figuras

Resumo

Summary

1 – INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Infecção por vírus respiratórios.....	03
1.2 Fatores prognósticos das infecções respiratórias virais.....	12
2 – OBJETIVOS.....	20
3 – MÉTODOS.....	22
4 – RESULTADOS.....	33
4.1 Vírus identificados.....	34
4.2 Características demográficas, antecedentes e comorbidades.....	37
4.3 Apresentação clínica e diagnósticos.....	39
4.4 Desfechos de gravidade.....	42
5 – DISCUSSÃO.....	50
6 – CONCLUSÕES.....	63
7 – ANEXOS.....	65
8 – REFERÊNCIAS.....	70

LISTA DE SIGLAS

IARI	Infecção do aparelho respiratório inferior
VSR	Vírus Sincicial Respiratório
MPV-h	Metapneumovírus humano
PIV	Parainfluenza vírus
IV	Influenza vírus
AdV	Adenovírus
RV	Rinovírus
BoV	Bocavírus
CoV	Coronavírus
PCR	Polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction
HU-USP	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
DCP	Divisão Clínica de Pediatria
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IU	Infecção única
CI	Coinfecção

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos oligonucleotídeos utilizados na detecção dos oito vírus respiratórios.....	31
Tabela 2 - Distribuição dos agentes virais identificados no grupo infecção única (IU).	35
Tabela 3 - Distribuição dos agentes virais identificados por no grupo coinfeção (CI).....	35
Tabela 4- Distribuição por faixa etária nos grupos infecção única (IU) e coinfeção (CI).....	38
Tabela 5 - Características e antecedentes dos pacientes nos grupos infecção única (IU) e coinfeção (CI)	39
Tabela 6 - Comparação dos principais sinais e sintomas clínicos admissionais nos grupos infecção única (IU) e coinfeção (CI).....	40
Tabela 7 - Comparação entre a necessidade de internação na UTI, necessidade de uso de oxigênio e necessidade de ventilação mecânica entre os grupos infecção única (IU) e coinfeção (CI).....	42

Tabela 8 - Comparação entre os desfechos de gravidade entre os grupos infecção única (IU) e coinfecção (CI).....	43
Tabela 9 - Comparação entre os grupos infecção única (IU) por VSR e coinfecção (CI) entre VSR e outros vírus em relação necessidade de internação em UTI, necessidade de ventilação mecânica e necessidade de oxigênio.....	44
Tabela 10 - Comparação entre os grupos infecção única (IU) por VSR e coinfecção (CI) entre VSR e outros vírus em relação ao tempo de internação, tempo de internação na UTI, tempo de ventilação mecânica e dias de uso de oxigênio.....	45
Tabela 11 - Comparação entre os grupos infecção única (IU) por adenovírus (AdV) e coinfecção (CI) entre adenovírus (AdV) e outros vírus em relação necessidade de internação em UTI, necessidade de ventilação mecânica e necessidade de oxigênio.....	46
Tabela 12 - Comparação entre os grupos infecção única (IU) por adenovírus (AdV) e coinfecção (CI) entre adenovírus (AdV) e outros vírus em relação ao tempo de internação, tempo de internação na UTI, tempo de ventilação mecânica e dias de uso de oxigênio.....	47

Tabela 13 - Comparação entre os grupos infecção única (IU) e coinfecção (CI)
em relação necessidade de internação em UTI, necessidade de
ventilação mecânica e necessidade de oxigênio.....48

Tabela 14 - Comparação entre os grupos infecção única (IU) e coinfecção (CI)
em relação ao tempo de internação, tempo de internação na UTI,
tempo de ventilação mecânica e dias de uso de oxigênio.....49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organograma do estudo.....	26
---------------------------------------	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição sazonal e porcentagem mensal das amostras com infecção única (IU) em relação ao total das amostras do grupo IU e porcentagem mensal das amostras com coinfeção (CI) em relação ao total das amostras do grupo CI.....	36
--	----

Gráfico 2- Distribuição mensal dos agentes virais mais prevalentes do grupo infecção única (IU) e coinfeção (CI).....	37
---	----

Gráfico 3 – Diagnósticos prevalentes do grupo infecção única (IU) e coinfeção (CI).....	41
---	----

RESUMO

De Paulis, M. Estudo comparativo das características clínicas das infecções por um ou mais vírus respiratórios em lactentes hospitalizados com doença aguda do aparelho respiratório inferior [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010

INTRODUÇÃO: As infecções do aparelho respiratório inferior (IARI) constituem importante causa de morbi-mortalidade nas crianças abaixo dos cinco anos de idade e são responsáveis por um grande número de hospitalizações. Os vírus são os seus principais agentes causadores. A maioria das IARI, na criança, tem um único agente viral identificado. Com o advento de técnicas moleculares, tornou-se possível a identificação de mais de um agente viral numa mesma amostra de secreção respiratória. No que diz respeito à gravidade da doença entre crianças infectadas por um único vírus em relação às crianças infectadas por dois ou mais vírus (coinfecção), a literatura científica revela-se conflitante. No presente estudo, os autores comparam a gravidade da infecção entre um ou mais agentes virais em crianças até 24 meses de idade hospitalizadas com infecção aguda do aparelho respiratório inferior e os possíveis fatores associados à evolução clínica. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** em estudo de coorte retrospectivo foram analisadas 304 crianças hospitalizadas com infecção respiratória aguda no período de fevereiro a novembro de 2005. Foram avaliadas as

características demográficas dos pacientes (idade, sexo), diagnóstico de alta, presença de fatores de risco para gravidade (prematuridade, displasia broncopulmonar, cardiopatia, imunodepressão, neuropatia) e os seguintes desfechos de gravidade: tempo de internação, necessidade e tempo de oxigênio, necessidade e tempo de internação em UTI, necessidade e tempo de ventilação mecânica. A técnica de PCR ou RT-PCR foi utilizada para identificação de oito vírus respiratórios: vírus sincicial respiratório (VSR), metapneumovírus humano (MPV-h), parainfluenza 1, 2 e 3 (PIV), Influenza A e B (IV A e B) e adenovírus (AdV). RESULTADOS: Foram identificados agentes virais em 219 (72%) crianças sendo que 158 (72%) crianças apresentaram infecção por um único agente viral (IU) e 61 (28%) apresentaram co-infecção (CI). O VSR foi o vírus mais freqüente em ambos os grupos. No grupo IU, o VSR esteve presente em 121 amostras (76,6%), seguido do AdV em 20 amostras (12,6%) e pelo MPV-h em 11 amostras (7%). No grupo CI, o agente mais identificado em associação com o VSR foi o AdV, presente em 24 amostras (39%) seguido do MPV-h em 16 amostras (26%). Não foi encontrada diferença entre os grupos IU e CI quanto à idade ($p=0,66$), sexo ($p=0,84$), história de prematuridade ($p=0,87$). A distribuição das infecções virais, segundo o mês de ocorrência, foi semelhante nos grupos IU e CI, predominando nos meses de abril, maio e junho. As infecções virais foram mais frequentes nas crianças menores de 1 ano de idade tanto no grupo IU como no grupo CI. A bronquiolite foi o diagnóstico mais freqüente em ambos os grupos (42% IU e 33% CI). Não houve

diferença, entre os dois grupos, quanto à necessidade de UTI ($p=0,12$), necessidade de oxigênio ($p=0,71$), necessidade de ventilação mecânica ($p=0,35$), tempo de internação ($p=0,18$), tempo de UTI ($p=0,8$), tempo de ventilação mecânica ($p=0,8$), tempo de oxigênio ($p=0,81$). **CONCLUSÃO:** A gravidade das infecções virais do aparelho respiratório inferior em lactentes hospitalizados foi semelhante tanto em pacientes com coinfeção como nos pacientes com infecção por um único agente.

Descritores: 1.Bronquiolite 2.Lactente 3.Sistema respiratório 4.Vírus sinciciais respiratórios 5.Índice de gravidade de doença

SUMMARY

De Paulis, M. Comparative study of clinical features of infections by one or more viruses in infants hospitalized with acute lower respiratory tract disease. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010.

BACKGROUND: Lower acute respiratory tract infections are a major cause of morbidity and mortality in children under five years of age and lead to a large number of hospitalizations. Acute bronchiolitis and pneumonia correspond to the main manifestations of these infections and viruses are the major etiologic agents. Whether the infections caused by one or more virus are associated with the disease severity is still controversial . **OBJECTIVES:** to compare the severity of the infection by one or more viral agents in children up to 24 months of age hospitalized with acute lower respiratory tract infection and the possible associated factors with clinical outcome. **PATIENTS AND METHODS:** A retrospective study of 304 children hospitalized with acute respiratory disease from February to November 2005. We evaluated the demographics (age, sex), disease severity risk factors (prematurity, bronchopulmonary dysplasia, heart disease, immunosuppression, neuropathy, absence of breastfeeding) and the following outcomes: length of hospitalization, oxygen therapy, admission in the ICU, need of mechanical ventilation. The PCR or RT-PCR was used to identify eight respiratory viruses: respiratory syncytial virus (RSV), human metapneumovirus (h- MPV), parainfluenzavirus 1, 2 and 3 (PIV), influenza A and

B (IV A and B) and adenovirus (AdV). RESULTS: Viral agents were identified in 219 (72%) children. Among them 158 (72%) were infected with a single viral agent and 61 (28%) had co-infection. RSV was the main etiologic agent in 121 samples (76.6%) in the patients with a single agent, followed by AdV in 20 samples (12.6%) and the h-MPV in 11 samples (7%). In the patients with co-infection, the most common association was the RSV and AdV (39%) followed by the RSV and h-MPV (26%). There was no statistically significant difference between the group with single viral agent and the group with co-infection regarding age ($p=0.66$), gender ($p=0.84$), history of prematurity ($p=0.87$) and history of breastfeeding until 6 months of age ($p=0.36$). The monthly distribution of viral infections was similar in both groups, predominantly in April, May and June. Children under one year of age were the most affected by acute lower respiratory tract infection in both groups. Bronchiolitis was the most frequent diagnosis in both groups. There was no difference between the groups regarding the need for ICU ($p=0.12$), oxygen requirement ($p=0.71$), need for mechanical ventilation ($p=0.35$), length of hospitalization ($p=0.18$), ICU stay ($p=0.8$), duration of mechanical ventilation ($p=0.8$), oxygen therapy ($p=0.81$). CONCLUSION: In children hospitalized with acute respiratory low tract infection caused by one or more type of virus configure the same disease severity profile.

Descriptors: 1. Bronchiolitis 2. infant 3. respiratory system
4. respiratory syncytial viruses 5. severity of illness index

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

As infecções do aparelho respiratório inferior (IARI) constituem importante causa de morbimortalidade em crianças abaixo de 5 anos de idade, principalmente nos países em desenvolvimento, onde segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorrem mais de 95% dos casos de pneumonias em crianças jovens. A incidência média é de 0,29 episódios/criança-ano o que representa cerca de 150 milhões de casos/ano, onze a 20 milhões de casos suficientemente graves para necessitarem de internação e aproximadamente quatro milhões de mortes anuais. Nos países desenvolvidos esta incidência é consideravelmente menor, cerca de 0,026 episódios/criança-ano, com baixa taxa de mortalidade ($<1/1000$ por ano)^{1,2}.

No Brasil, segundo dados governamentais, foram registradas 1.816.218 internações em crianças abaixo dos 5 anos de idade, decorrentes de pneumonia, bronquiolite e bronquite aguda, nos anos de 2003 a 2007. Estas são as principais formas de apresentação das IARI^{3,4,5}. A maior parte desses registros ocorreu na região Sudeste (34,36%), seguida das regiões Nordeste (29,26%), Sul (15,69%), Norte (11,76%) e Centro-Oeste (8,89%). No Estado de São Paulo foram registrados 47,84% das internações da região Sudeste por infecção de vias aéreas inferiores nas crianças menores do que 5 anos de idade. O município de São Paulo contou com 26,69% dos casos do estado (www.datasus.gov.br).

Crianças com idade abaixo de 1 ano são mais susceptíveis às IARI. Nesta faixa etária, estima-se que as infecções respiratórias agudas sejam responsáveis por 2,6 milhões de mortes por ano em todo o mundo, sendo que cerca de 300.000 mortes por pneumonia ocorrem no período neonatal⁶. No Brasil, no ano de 2009, foram registradas 210.257 internações em crianças abaixo de 1 ano de idade por doença do aparelho respiratório. Pneumonia, bronquiolite e bronquite aguda, foram responsáveis por 76% dessas admissões hospitalares.

As IARI apresentam-se, em geral, com sinais e sintomas de infecções de vias aéreas superiores seguidos por tosse e febre persistentes, taquipnéia e desconforto respiratório, em graus variáveis de intensidade. A presença de crepitações e ruídos adventícios, como roncos e sibilos, são frequentes e ocorrem nas infecções independentemente de sua etiologia⁷.

1.1 Infecções por vírus respiratórios

A maioria das IARI, na criança, é causada por vírus, sendo o vírus sincicial respiratório (VSR) o mais frequentemente identificado⁸.

A infecção pelo VSR é responsável por cerca de 50 a 90% das hospitalizações decorrentes de bronquiolite, cinco a 40 % das internações por pneumonia e 10 a 30% das internações por traqueobronquite^{9,10}. Outros agentes virais também destacam-se como causadores de infecções em vias aéreas inferiores, como: metapneumovírus (MPV-h), adenovírus (AdV), vírus parainfluenza (PIV) 1, 2 e

3, vírus influenza (IV) A e B, e mais recentemente rinovírus (RV), coronavírus (CoV) e bocavírus (BoV).

O VSR é um vírus RNA pertencente à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, classificado em dois grandes grupos: o grupo A e o grupo B e em diversos genótipos.

As infecções de vias aéreas inferiores por VSR, em geral, acometem crianças até 2 anos de idade, com pico de incidência nos primeiros 6 meses de vida, sendo responsável por mais de 120.000 hospitalizações pediátricas por ano nos Estados Unidos¹¹. Em estudos realizados no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), que avaliaram a etiologia da infecção em lactentes até 1 ano de idade hospitalizados com doença do aparelho respiratório inferior, o VSR foi isolado em até 61% dos casos.

Além da morbidade causada pelo quadro agudo, outro aspecto relevante da infecção pelo VSR é a sua associação com a asma na infância. Cerca de 40 a 50% das crianças hospitalizadas por bronquiolite desenvolvem episódios de sibilância recorrente, principalmente até os seis primeiros anos de vida^{9,12}.

O VSR é altamente infectante. Estudos de soroprevalência de anticorpos contra VSR mostram que até os três a cinco anos de idade, cem por cento das crianças foram infectadas pelo VSR. No entanto, mesmo com a presença de anticorpos séricos específicos, as infecções e reinfecções podem ocorrer^{9,11}. A distribuição das infecções por VSR, habitualmente ocorre em estações anuais. Na cidade de São Paulo, a maior incidência de VSR acontece nos meses mais frios do ano, como em outros países da América do Sul e de clima subtropical

ou temperado^{13,14}. Em São Paulo, as estações de VSR têm início nos meses de março-abril e persistem até julho/agosto, com o maior número de casos ocorrendo no mês de maio¹³. No nordeste, o pico de infecções respiratórias por VSR ocorre, comumente, nas estações de chuva^{15, 16}.

O metapneumovírus humano (MPV-h) foi recentemente descrito como agente causador de infecção de vias aéreas inferiores, no entanto, estudos sorológicos indicam que o MPV-h, há mais de 50 anos, seja responsável por infecções de vias aéreas no mundo todo¹⁷. Também pertence à família dos *Paramyxovirus* e à subfamília *Pneumovirinae*, da qual o VSR faz parte¹⁷. Também, de forma semelhante ao VSR, são identificados filogeneticamente dois grupos do MPV-h, grupos A e B e vários subgrupos, que circulam de forma concomitante durante o ano, porém, sempre com a predominância de um deles¹⁷. As infecções por MPV-h podem apresentar padrão sazonal, porém as estações não são tão bem definidas como as do VSR. Estudo de vigilância de oito vírus respiratórios, realizado na Cidade de São Paulo, mostrou que o MPV-h teve uma distribuição constante durante o ano todo, com picos de incidência menos marcados que o VSR¹⁸. Períodos de maior ocorrência de infecções por MPV-h foram descritos, principalmente, no final do inverno e início da primavera, e final da primavera e início do verão¹⁹. O MPV-h causa infecção de vias aéreas superiores e inferiores em pacientes de todas as idades, no entanto, as infecções mais graves ocorrem principalmente nas crianças jovens, abaixo dos 5 anos de idade e nos adultos acima dos 65 anos de idade¹⁷. Estudos sorológicos mostram que a maioria das crianças com idade de 5 anos

já foi infectada pelo MPV-h, sessenta por cento delas encontram-se abaixo de 1 ano de idade, geralmente ao redor dos 11 meses por ocasião da primeira infecção¹⁷. Cerca de 12% das infecções de vias aéreas inferiores estão associadas ao MPV-h e 4 a 6% das crianças infectadas necessitam de hospitalização¹⁷. Os sintomas clínicos podem envolver vias aéreas superiores, incluindo rinofaringite e laringite, e vias aéreas inferiores, manifestando-se como bronquiolite (59%), pneumonia (8%) e exacerbação de asma (14%). Os achados clínicos mais frequentes são: tosse (68 a 90%), rinite (44 a 77%), febre (52 a 86%), sibilância (51 a 56%).

O vírus parainfluenza (PIV) apresenta características estruturais, patogênicas, epidemiológicas e clínicas semelhantes ao VSR⁹. É um vírus RNA pertencente à família *Paramyxovirus*, subfamília *Paramyxoviridae*. O PIV é responsável por 50% das infecções de vias aéreas superiores nas crianças, sendo que 30 a 50% são complicadas por otite média²⁰. Cerca de 15% das infecções acometem as vias aéreas inferiores, causando a hospitalização de 2,8 crianças/1000 acometidas por essa infecção^{9,20}. Foram descritos quatro sorotipos do vírus parainfluenza: 1, 2, 3 e 4. Os sorotipos PIV 2 e PIV 3 predominam no outono e primavera. O sorotipo 3 é o mais prevalente e está associado à bronquiolite e à pneumonia, principalmente nos primeiros 6 meses de vida, com uma frequência menor que a infecção pelo VSR^{9,20}. Cerca de 90 a 100% das crianças por volta dos 5 anos de idade apresentam anticorpos contra esse sorotipo. Os PIV 1 e 2 estão associados ao crupe em crianças entre os 2 e os 6 anos de idade^{9,20}. Até os 5 anos de idade, 74% das crianças apresentam

anticorpos contra a infecção pelo PIV 1 e 50% apresentam anticorpos contra a infecção pelo PIV 2²⁰. O PIV 4 geralmente é responsável por infecções com sintomas leves de vias aéreas superiores em crianças previamente híginas, sendo que lactentes e crianças portadoras de comorbidades podem desenvolver pneumonia e bronquiolite²⁰.

O vírus influenza é um vírus RNA, classificado em subtipos A e B. Geralmente, ocorre de forma epidêmica mundialmente, principalmente nos meses frios. Em crianças saudáveis causa infecções agudas não complicadas e autolimitadas, ao contrário do que ocorre nas crianças muito jovens e/ou com alguma patologia prévia, onde as infecções apresentam evolução mais grave e podem necessitar de internação²¹. A taxa de hospitalização nas crianças previamente híginas menores que 5 anos de idade é de 100/100.000 crianças, ao passo que para as crianças portadoras de comorbidades, essa taxa aumenta para 500/100.000 crianças²¹. Cerca de 80% das crianças internadas por infecção confirmada pelo vírus influenza apresentam idade inferior a 2 anos de idade, das quais 50 % são menores de 6 meses²¹. A maior taxa de mortalidade é observada em crianças saudáveis abaixo dos 6 meses de idade. A manifestação clínica da infecção pelo vírus influenza depende da idade e de contato prévio com o vírus. Podem ser observados sinais e sintomas variáveis com acometimento de vias aéreas superiores e inferiores, geralmente com febre de início abrupto, temperaturas superiores a 39°C, obstrução nasal, tosse, taquipnéia, dor de cabeça e mialgia. Podem ocorrer conjuntivite, convulsão febril e sintomas gastrointestinais. Além do trato respiratório, o vírus influenza

pode acometer outros órgãos e sistemas ocasionando complicações como meningites, encefalites, rabdomiólise, miosite, miocardite, pericardite e síndrome do choque tóxico²¹.

As manifestações clínicas da infecção de vias aéreas inferiores pelo vírus influenza podem ser semelhantes às infecções causadas por VSR e PIV. A pneumonia corresponde à apresentação respiratória de maior gravidade da infecção por influenza, particularmente em crianças que apresentem fatores associados a pior prognóstico^{22,23}. Não raramente, a pneumonia bacteriana secundária causada pelo *Staphylococcus aureus*, acomete crianças infectadas por influenza²¹.

O adenovírus é constituído por uma dupla fita de DNA. De acordo com os determinantes antigênicos, podem ser identificados 51 sorotipos. Esses sorotipos são classificados em seis subgrupos de A a F os quais são responsáveis por manifestações clínicas diferenciadas²⁴. O adenovírus apresenta uma distribuição universal e suas infecções ocorrem durante o ano todo. São causa de 5 a 10% das doenças febris em crianças jovens, sendo os subgrupos C 1, 2 e 5 os mais comumente isolados²⁴. As manifestações clínicas da infecção por adenovírus são variáveis dependendo da idade do paciente e do estado imunológico e podem acometer diversos órgãos e sistemas. O adenovirus é responsável por aproximadamente 10% das pneumonias nas crianças, sendo que os subgrupos B 3, 7 e 21 estão associados às pneumonias mais graves e com maiores índices de complicação. Existe uma alta incidência de seqüelas pulmonares, especialmente bronquiectasias, em crianças

acometidas por infecções por adenovírus²⁴. Geralmente, a evolução desfavorável e fatal ocorre em recém-nascidos e crianças com outras patologias prévias²⁴.

Mais recentemente o rinovírus tem sido implicado na etiologia das pneumonias. Trata-se de um vírus RNA pertencente à família *Picornaviridae*, na qual estão inclusos os enterovírus (poliovírus, coxsackievírus, ecovírus e outros) e o vírus da hepatite A²⁵. O rinovírus apresenta 110 sorotipos diferentes e é constituído por quatro proteínas estruturais: VP1, VP2, VP3 e VP4. As proteínas VP1 a VP3 são mais externas sendo que a grande variação antigênica se deve à proteína VP1²⁵. O rinovírus é responsável por cerca de 30% de todas as infecções virais de vias aéreas superiores, sendo que crianças abaixo de 1 ano de idade são as mais acometidas²⁶. Em estudo realizado nos Estados Unidos, 26% das internações decorrentes de infecções de vias aéreas em crianças com idade inferior a 5 anos, foram devidas ao rinovírus²⁶. As maiores taxas de hospitalização foram observadas nas crianças abaixo dos 6 meses de idade (17 internações/1000 crianças) e também nas crianças com história prévia de sibilância ou asma (25 internações/1000 crianças)²⁶. Vários grupos de rinovírus cocirculam em determinada estação, podendo ser isolados durante períodos de infecção consecutivos²⁶. Geralmente, em climas tropicais, os picos de infecção ocorrem nas estações de chuva, ao passo que em climas temperados os picos de infecção ocorrem no início do outono e na primavera²⁶. O rinovírus está mais associado às infecções de vias aéreas superiores (resfriado comum, sinusite, otite média aguda), exacerbações de doenças

pulmonares crônicas, bronquite e exacerbações de asma. As infecções graves de vias aéreas inferiores por rinovírus, ocorrem em lactentes abaixo de 6 meses de idade e em portadores de doenças pulmonares prévias ou outras condições predisponentes como prematuridade, cardiopatia congênita, fibrose cística e doenças neurológicas. Os rinovírus são responsáveis por 15% dos casos de pneumonia neonatal e a taquipnéia, diminuição da aceitação alimentar, letargia e apnéia, podem ser manifestações clínicas freqüentes²⁶. Geralmente, as infecções por rinovírus não causam febre alta, mialgias ou calafrios, devendo-se pesquisar outra causa de infecção quando estes sintomas ocorrem²⁶. Na Grécia, estudo utilizando a técnica de RT-PCR encontrou rinovírus em 29% das crianças hospitalizadas com bronquiolite e sua presença aumentou em cinco vezes o risco de desenvolver doença grave ⁽²⁶⁾. Em outro estudo, também utilizando a técnica de RT-PCR, o rinovírus foi detectado em 58% dos casos de broquiolite ambulatorial, sendo o vírus mais freqüentemente isolado em 41% das crianças com quadro agudo de coriza associada a quadro pulmonar e em 45% dos episódios de sibilância²⁶.

O coronavírus corresponde a um RNA vírus constituído por quatro ou cinco proteínas estruturais. Os coronavírus são classificados em três grupos antigênicos distintos que são espécie específicos e célula específicos²⁷. Existem quatro coronavírus humanos identificados: HCoV-229E e HCoV-OC43 que causam o resfriado comum; o SARS-CoV que causa doença respiratória grave e o HCoV-NL63 que foi isolado em crianças com bronquiolite e pneumonia e em 3% das crianças com infecção de vias aéreas inferiores de etiologia não

conhecida²⁷. Nas áreas tropicais e subtropicais, diferentes grupos de coronavírus podem circular em diferentes estações, incluindo a primavera e o verão. Nos climas temperados o coronavírus causa infecções no outono e no inverno. Em estudo realizado em Connecticut, crianças com sintomas respiratórios que apresentaram tosse, rinorréia, taquipnéia, febre e hipóxia, tiveram suas amostras respiratórias submetidas à análise através da técnica de RT-PCR. O coronavírus foi identificado em 9% dessas amostras²⁷. Este vírus pode estar associado à doença respiratória grave em crianças com fatores de risco predisponentes, porém crianças sem doença prévia também podem apresentar infecções de vias aéreas inferiores causadas por coronavírus²⁸.

O bocavírus é um vírus DNA recentemente descrito, em 2005, associado às infecções do aparelho respiratório nas crianças. Compõe a família *Parvoviridae* e tem sido detectado com uma frequência variável de 2% a 18% em crianças com infecção respiratória aguda, ocorrendo, geralmente, em associação com outros vírus^{29,30}. Acomete principalmente crianças de 6 meses a 4 anos de idade ⁽³¹⁾, sendo responsável por infecções do aparelho respiratório superior, bronquiolite e pneumonia³⁰. De acordo com estudos soroepidemiológicos no Japão, quase todas as crianças apresentam evidência sorológica de infecção prévia pelo h-BoV até os 5 anos de idade ²⁹. Este agente, geralmente não está presente em crianças assintomáticas. A sazonalidade ocorre durante o ano todo mas predomina durante o inverno^{29,30,31}. Estudos ainda são necessários para esclarecer o seu papel na etiologia das infecções respiratórias.

1.2 Fatores prognósticos das infecções respiratórias virais

Os diferentes agentes virais apresentam características estruturais peculiares e podem determinar manifestações clínicas variáveis, de maior ou menor gravidade, quando da sua interação com o hospedeiro. Idade, estado nutricional, estado de imunização, condições sócio econômicas, condições ambientais e presença de doenças prévias constituem fatores que podem determinar o prognóstico³².

Crianças menores de 1 ano são as que apresentam os quadros mais graves de infecções por VSR^{33,34}. Além do fato das vias aéreas serem pequenas³², e a função pulmonar deficiente³⁵, crianças de baixa idade apresentam imaturidade fisiológica da imunidade inata e da imunidade humoral e celular. A consequência disso é a maior susceptibilidade para infecções virais durante as primeiras 4 a 8 semanas após o nascimento³⁶. Vários estudos apontam idade inferior a 6 semanas e comprometimento da função imunológica como fatores agravantes da infecção por VSR³⁶.

A morbidade da infecção pelo VSR é maior em crianças prematuras, com broncodisplasia ou com cardiopatia congênita quando comparadas às crianças previamente hígdas^{37,38,39}. Em estudo realizado em menores de três anos de idade, foram comparadas as crianças com e sem fatores de risco para gravidade, em relação à taxa de hospitalização por infecção por VSR. As crianças previamente saudáveis com idade inferior a 12 meses tiveram uma

taxa de hospitalização maior do que as crianças entre 12 e 23 meses (29,5/1000 crianças-ano e 3,7/1000 crianças-ano, respectivamente). Crianças com fatores de risco, principalmente cardiopatas e prematuras, tiveram uma taxa de hospitalização duas a três vezes maior que as crianças saudáveis. A maior taxa de internação foi observada em crianças com broncodisplasia no primeiro ano de vida, a qual foi cerca de 13 vezes maior quando comparadas às crianças sem fatores de risco (388,4/1000 crianças-ano). Essa taxa diminuiu no segundo ano de vida (73,4/1000 crianças-ano)^{38,40}. Crianças com doenças de base ficaram mais tempo internadas quando comparadas às crianças saudáveis (8,6 a 11,8 dias vs 4,6 a 6,7 respectivamente)^{38,40}. A necessidade de UTI também foi maior em crianças com fatores de risco em relação às crianças previamente híginas (35% vs 15%). O mesmo foi observado em relação à necessidade de ventilação mecânica (21% vs 8%).

As taxas de mortalidade também são mais elevadas em portadores de comorbidades³⁹. A mortalidade, que em geral é muito baixa em países desenvolvidos (0,01 a 0,10%), pode ser maior que 2 a 3% nesses casos³⁸.

Crianças com comorbidades nascidas com idade gestacional inferior a 36 semanas apresentam uma taxa de mortalidade maior quando comparadas às crianças com idade gestacional maior que 37 semanas (39/100.000 e 6,8/100.000 respectivamente). Quando não há fator de risco, a mortalidade ainda é alta nas crianças com idade gestacional menor do que 36 semanas (27,4/100.000) se comparado com crianças com idade gestacional maior do que 37 semanas (5,4/100.000)¹⁰.

Outro aspecto importante no prognóstico das infecções virais é o papel das coinfeções bacterianas. A associação de agentes virais e bacterianos tem sido relatada como ocorre na coinfeção que envolve o vírus influenza e a bactéria *S.aureus*. É possível que ocorra maior adesão do *S. aureus* ao epitélio traqueobrônquico mediada pela atividade das neuraminidases do vírus, o que facilitaria o desenvolvimento da infecção bacteriana secundária. O vírus influenza pode causar a supressão da função fagocítica dos neutrófilos e macrófagos pulmonares^{23,41,42}. Uma outra explicação para a ocorrência da coinfeção seria o aumento da colonização da nasofaringe das crianças, principalmente entre os 6 a 11 anos de idade, por *S.aureus* meticilinoresistente nos últimos dez anos^{22,23}. Cerca de 30 a 40% das crianças são colonizadas com *S. aureus*²². Alguns autores sugerem que as coinfeções por influenza e *S.aureus* ocorrem em crianças mais jovens e apresentam evolução mais grave. No ano de 2006-2007, nos Estados Unidos, 30% das mortes pediátricas registradas por influenza tiveram evidência de pneumonia ou bacteremia por *S. aureus*²². Estudo realizado na Georgia, no período de outubro de 2006 a abril de 2007, incluiu pacientes com idade inferior a 18 anos internados com infecção confirmada por influenza, sendo a maior parte deles portadores de comorbidades (71%). Todos os pacientes foram submetidos a pesquisa para bactérias em materiais biológicos, primariamente estéreis, até 3 dias da admissão. Quinze por cento dessas crianças hospitalizadas com influenza tiveram coinfeção com bactérias, sendo 11% por *S.aureus* que se apresentou sob as formas clínicas de pneumonia (72%), bacteremia (14%) e exacerbação

de fibrose cística (14%). As crianças com coinfeção influenza/*S. aureus* tiveram idade intermediária (7 anos) quando comparadas às crianças com infecção única por influenza (4 anos) e *S.aureus* (10 anos). As coinfeções conferiram maior tempo de hospitalização, maior taxa de admissão em UTI (71%) quando comparadas às infecções únicas por influenza (28%) ou por *S. aureus* (36%). A taxa de mortalidade também foi maior nas crianças portadoras de coinfeções (29%) comparadas às sem coinfeção (0% influenza, 5% *S. aureus*)²². Dados semelhantes foram encontrados no estudo de Finelli²³, no qual o *S.aureus* foi a bactéria mais freqüente nas crianças com influenza. Cerca de 45% das crianças tinham doença de base e idade maior (10 anos) quando comparadas com as crianças com infecção única por influenza (5 anos). Nesse estudo 60% das bactérias *S.aureus* foram metilicilinoresistentes²³.

Menos esclarecido é o papel da presença de mais de um vírus respiratório no prognóstico das infecções. O emprego da técnica da *Polymerase chain reaction* (PCR) permitiu não só ampliar a identificação de novos vírus respiratórios como também a identificação de mais de um agente viral numa mesma amostra coletada da secreção respiratória. A identificação de dois ou mais vírus, é descrita como coinfeção, infecção viral mista ou codeteção^{43,44,45}. O significado da identificação de dois ou mais vírus ainda não está bem esclarecido na literatura, principalmente em relação ao papel patogênico de alguns agentes virais e ao impacto sobre a gravidade clínica da doença.

A prevalência da coinfeção viral, nas bronquiolites, pode variar de 15 a 30%, principalmente em crianças internadas^{43,46,47}. Há relatos de que a taxa de co-infecção pode variar de 0 a 70%^{43,48}, porém, a maioria dos estudos mostra uma taxa de CI ao redor de 15 a 30%^{5,34,46,49,50,51}.

Não há uma uniformidade na literatura no que diz respeito a prevalência dos agentes virais envolvidos nas coinfeções. Dependendo da população estudada, da época do ano, e do método de identificação viral empregado, existem variações na prevalência dos vírus e consequentemente, das associações virais. Apesar destas variações, o VSR geralmente está presente na maioria dos trabalhos científicos^{46,49}. Os vírus mais frequentemente descritos em associação com o VSR são MPV-h, AdV, RV, BoV e CoV^{46,48,52,53,54,55,56,57}.

Também são controversos os aspectos relacionados a avaliação da gravidade das coinfeções virais. Os parâmetros habitualmente utilizados para determinar a gravidade da IARI compreendem o uso de oxigênio, a necessidade de internação em UTI e a necessidade de uso de ventilação mecânica^{43,32,48,58}. Alguns estudos consideram, também, a indicação de terapia com ribavirina e dados laboratoriais ($\text{PaO}_2 < 50$ e $\text{PaCO}_2 > 50$ mmHg) como critérios de gravidade⁵⁹.

Em estudo realizado por Wolf⁶⁰, observou-se que a coinfeção pelo MPV-h não aumentou a gravidade da doença quando compararam-se as crianças com infecção viral isolada do trato respiratório inferior causada por MPV-h, por VSR ou IV A. Em contrapartida, Semple e cols⁵⁸ sugeriram, através de um estudo retrospectivo realizado nos meses de inverno de 2001 e 2002,

que a coinfeção entre MPV-h e VSR aumentou a gravidade da doença com necessidade de internação em UTI e indicação de ventilação mecânica.

Diferentemente, Cuevas e cols⁶¹ observaram maior gravidade em pacientes com infecção única por VSR. A hipóxia grave ($\text{PaO}_2 < 90\%$) foi menos frequentemente observada na infecção única por MPV-h ou na coinfeção por VSR/MPV-h quando comparada à infecção única pelo VSR.

Outros estudos também sugeriram a associação entre infecção única por VSR e maior gravidade. Alguns autores mostraram que em coinfeções, onde o VSR não foi isolado, não houve manifestação clínica grave. Nesses casos, a produção de IFN gama não esteve tão diminuída, como na presença do VSR, ou esteve até mesmo aumentada^{62,63,64,65,66}.

Na prática clínica, a identificação da coinfeção viral gera dúvidas quanto à conduta e ao prognóstico. Os cuidados adequados para prevenção da transmissão intra hospitalar são diferentes e variam em acordo com a agente viral. O vírus sincicial respiratório, PIV e MPV-h são transmitidos, predominantemente, por contato direto com secreções e demandam precauções de contato. O vírus influenza e AdV são transmitidos também por gotículas e requerem isolamento respiratório para evitar a sua transmissão. Assim, a detecção de VSR isoladamente não demanda isolamento para gotículas o que muda na coinfeção que envolve esse agente e AdV ou influenza^{11,21}.

Outro aspecto da conduta clínica influenciado pela presença de mais de um vírus respiratório é a terapêutica específica. Assim sendo, em crianças com VSR positivo a pesquisa positiva também para IV pode contribuir para a instituição de terapêutica específica para influenza.

Uma das situações mais frequentes na prática rotineira é a dúvida quanto à evolução clínica e a gravidade das coinfeções virais. O prognóstico das coinfeções por mais de um vírus permanece obscuro.

No presente estudo, os autores pretendem comparar a gravidade da infecção por um ou mais agentes virais em lactentes hospitalizados com doença aguda do aparelho respiratório inferior e os possíveis fatores associados à evolução clínica. Serão analisados os vírus respiratórios mais frequentemente associados às infecções em crianças, nesta situação.

HIPÓTESE DO ESTUDO

A coinfeção por dois ou mais vírus respiratórios é frequente em lactentes hospitalizados com IARI e pode ter evolução clínica e gravidade diferentes da infecção por um único agente viral.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar a prevalência e a gravidade das infecções por um vírus e das coinfeções por dois ou mais vírus respiratórios, em crianças de 0 a 2 anos de idade hospitalizadas com doença aguda do aparelho respiratório inferior.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar a ocorrência de um ou mais vírus respiratórios, discriminando cada agente identificado, em lactentes hospitalizados com IARI
- 2- Avaliar a presença dos seguintes fatores associados à gravidade dos quadros de IARI: idade, sexo, diagnóstico, antecedentes e comorbidades.
- 3- Avaliar a gravidade das infecções, segundo os seguintes desfechos: tempo de internação, necessidade de oxigênio, tempo de oxigênio, necessidade de internação em UTI, tempo de internação em UTI, necessidade de ventilação mecânica e tempo de ventilação mecânica.
- 4- Analisar a associação entre a ocorrência de um ou mais agentes virais, os fatores de risco para doença grave e os desfechos de gravidade.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foi realizado estudo de coorte histórica que avaliou crianças hospitalizadas, com doença respiratória aguda do aparelho respiratório inferior, no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) durante o período de fevereiro a novembro de 2005.

O HU-USP caracteriza-se por ser um hospital geral secundário que oferece assistência à saúde para a população residente na região oeste da Cidade de São Paulo, como também funcionários e alunos da Universidade de São Paulo e seus dependentes. A região está subdividida em cinco distritos: Butantã, Morumbi, Raposo Tavares, Rio Pequeno e Vila Sônia. Esta área corresponde a 3,75% da área total do município de São Paulo e compreende uma população de aproximadamente 400 mil habitantes (www.prefeitura.sp.gov.br).

O HU-USP dispõe de 88 leitos pediátricos distribuídos em 10 leitos de UTI, 6 leitos de UTI neonatal, 24 leitos de berçário, 36 leitos de enfermaria e 12 leitos de observação no Pronto Atendimento. Em média são atendidas 70.000 crianças/ano no Pronto Atendimento e 15.000 crianças/ano no ambulatório de pediatria geral. Anualmente são internadas aproximadamente 1.900 crianças na Divisão Clínica de Pediatria do HU-USP (DCP HU-USP).

Segundo a rotina de atendimento na DCP-HU, durante o período estudado, foram coletadas amostras de secreção de nasofaringe para pesquisa viral dos

lactentes hospitalizados com problemas respiratórios. Esta coleta não foi realizada em dias de feriados e finais de semana por motivos operacionais.

Foram considerados critérios de inclusão para este estudo:

- idade inferior a 24 meses
- internação na enfermaria geral, na unidade de terapia intensiva (UTI) ou na unidade de neonatologia, com quadro de doença aguda do aparelho respiratório inferior definida por história clínica com duração menor de sete dias com queixas de tosse e desconforto respiratório ou presença de taquipnéia, com ou sem dispnéia e ruídos adventícios à ausculta pulmonar.

Foram considerados critérios de exclusão:

- coleta de secreção de nasofaringe para pesquisa de vírus respiratórios, após os primeiros cinco dias de internação. Este período foi definido para selecionar casos de aquisição viral comunitária e minimizar a possibilidade de aquisição nosocomial da infecção⁶⁷.
- internação prévia nos últimos 30 dias. Este critério foi definido para excluir quadros de recaída de infecções recentes ou prolongadas e aquisição nosocomial da infecção⁶⁸.

- hemocultura positiva para agente bacteriano, para evitar fatores de confusão na evolução da doença associados a coinfeção com bactérias.
- outros diagnósticos clínicos de infecções associadas (como otites, sinusites, derrame pleural e outros), para evitar fatores de confusão na evolução da doença.

DELINEAMENTO DO ESTUDO

No período de estudo foram atendidas 492 crianças menores que 24 meses de idade com infecção aguda do aparelho respiratório inferior que tiveram coleta de secreção de nasofaringe.

Foram excluídas 156 crianças: 97 por coleta acima de cinco dias; 44 reinternações e 15 com outros diagnósticos associados ou hemoculturas positivas (2 empiemas, 2 hemoculturas e 1 contra imunoeletroforese positivas para *Streptococcus pneumoniae*, 1 onfalite, 4 febres sem sinais localizatórios, 1 diarreia, 2 pneumonias lobares, 1 CMV positivo, 1 toracotomia com decorticação). Portanto, iniciaram o estudo 336 crianças, porém, foram extraviadas 21 amostras e não foram encontrados 11 prontuários, o que resultou em 9,5% de perdas. Assim, foram estudadas 304 crianças. Figura 1.

Figura 1 - Organograma do estudo

Não houve necessidade do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos responsáveis da criança, pois os exames laboratoriais faziam parte da rotina diagnóstica do serviço e a coleta de dados foi retrospectiva.

A análise dos prontuários das 304 crianças foi realizada, pela autora MP, por meio do preenchimento de protocolos para avaliação das seguintes variáveis:

- características demográficas dos pacientes (idade em meses e sexo)
- sinais e sintomas segundo a história clínica à admissão
- diagnóstico à alta
- presença de fatores de risco para gravidade (prematuridade, definida por idade gestacional menor que 37 semanas, diagnóstico prévio de displasia broncopulmonar, cardiopatia, imunodepressão ou neuropatia).
- história de aleitamento materno (considerado aleitamento materno exclusivo até os 6 meses de idade)

Foram também recuperados dos prontuários os seguintes desfechos:

- tempo total de internação
- necessidade de oxigenioterapia
- tempo de oxigenioterapia
- necessidade de internação em unidade de terapia intensiva
- tempo de internação em unidade de terapia intensiva
- necessidade de ventilação mecânica
- tempo de ventilação mecânica.

Os protocolos utilizados para a coleta dos dados acima citados estão apresentados nos Anexos A e B.

Foram analisados os resultados obtidos da pesquisa viral das amostras de secreção de nasofaringe. Segundo a rotina do serviço, na época do estudo, os espécimes foram obtidos por aspirado de nasofaringe coletado por técnicos de enfermagem treinados ou fisioterapeutas. A técnica empregada utilizou luvas estéreis, sonda de aspiração nasal conectada à extensão de silicone do coletor de mucosidade e a rede de vácuo de parede ligada à outra extremidade do coletor. Durante o procedimento foi oferecido oxigênio ao paciente e monitorada a oximetria de pulso. Foi realizada a aspiração de uma das narinas aleatoriamente. Ao final do procedimento acrescentou-se um mililitro de solução fisiológica ao frasco coletor. As amostras foram acondicionadas em isopor com gelo seco e transportadas a uma temperatura de 4°C ao Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (ICB II-USP) para processamento⁶⁹.

Foram pesquisados, através da técnica de PCR ou RT-PCR, oito vírus respiratórios: vírus sincicial respiratório (VSR), metapneumovírus humano (MPV-h), parainfluenza 1, 2 e 3 (PIV), Influenza A e B (IV A e B) e adenovírus (AdV).

Segundo a rotina do laboratório, em um período máximo de 4 horas após a coleta, o aspirado foi misturado, homogeneizado e tratado com 1000 U/mL de penicilina e 1000 µL/mL de estreptomicina (Gibco BRL CIDADE). Após 30 minutos a 4°C as amostras (cerca de 3 mL) foram separadas em quatro

alíquotas: 600 µL para inoculação em cultura celular, 1500 µL para imunofluorescência indireta (IFI), 250 µL para RT-PCR (transcriptase-reversa) após acrescentar 750 µL de Trizol LS (Gibco BRL CIDADE) e o restante, foi armazenado a -70°C após adição de meio de congelamento, volume a volume (meio mínimo essencial EAGLE modificado com sais de EARLE, com glutamina- Sigma, acrescido de antibióticos, 10% de soro fetal bovino (SFB- Cultilab CIDADE) e 10% de glicerina esterilizada (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). O RNA viral foi extraído das alíquotas das amostras clínicas acrescidas de Trizol armazenadas em freezer a -70 °C. Todo o processo de extração foi realizado em banho de gelo, reagentes gelados e centrifuga refrigerada (Centrifuge 5804R Eppendorf- rotor F45-36-8). A esta mistura foi adicionado 20% de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 (Merck-Sigma), homogeneizado em vórtex e incubado em banho de gelo por cinco minutos. A seguir, foi centrifugado a 12.000g durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante, cerca de 400µl, foi transferido para outro tubo contendo isopropanol volume a volume, homogeneizado em vórtex e incubado por 15 minutos em gelo. Após a centrifugação, de 12000g durante 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e ao restante acrescentou-se 800µL de etanol 75% seguindo-se de uma centrifugação a 9.000g durante 8 minutos a 4° C. O sobrenadante foi novamente desprezado por inversão e o *pellet*, após secagem, ressuspenso em 50µL de água DEPC (fabricante, cidade) 40U de inibidor de RNase

(Rnasin[®]) e seguindo-se imediatamente para o protocolo de obtenção de cDNA.

A transcrição reversa (RT) foi realizada com o auxílio do *High Capacity cDNA Archive kit*, conforme instruções do fabricante (*Applied Biosystems[®], Foster City, CA*). Uma alíquota de 50µl do RNA extraído foi diluída em tampão de reação contendo 50 pmoles de *Random primers*, 50 mM de Tris-HCl [pH 8.3 a 25°C] / 75 mM de KCl / 3 mM de MgCl₂ (10x RT Buffer), 10 mM de Dithiothreitol, 250U de MultiScribe RT enzyme, 02U de Inibidor de RNase, 1.5mM dNTP mixture e água UltraPure (Gibco[®] cidade) para um volume final 100µl. A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguida de 37°C por 120 minutos sendo utilizado termociclador ABI 9700 (*Applied Biosystems[®], Foster City, CA*).

As sequências alvos para a detecção dos vírus respiratórios foram regiões da subunidade F1 do gene de glicoproteína de fusão do HRSV e do HMPV, do gene de hemaglutinina-neuraminidase (HN) para HPIV-1, 2 e 3, genes de proteína não estrutural (NS1) do vírus influenza A e B e finalmente do gene hexon para AdV. As características de cada oligonucleotídeo no genoma viral e seus respectivos tamanhos esperados, dos produtos amplificados estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação dos oligonucleotídeos utilizados na detecção dos oito vírus respiratórios

Vírus	Primer ID	Gene	Localização	Polaridade	Seqüência (5'>3')	Tamanho Amplicon (bp)
HVSR	VSRAB-F1 VSRAB-R1	F	1111-1134 1468-1490	+ -	AACAGTTTAACATTACCAAGTGA TCATTGACTTGAGATATTGATGC	380
HPIV 1	HPIV1-F1 HPIV1-R1	HN	780-801 1076-1096	+ -	CCGGTAATTTCTCATACCTATG CCTTGGAGCGGAGTTGTTAAG	317
HPIV 2	HPIV2-F1 HPIV2-R1	HN	845-866 1027-1048	+ -	CCATTTACCYAAGTGATGGAAT GCCCTGTTGTATTGGAAGAGA	203
HPIV 3	HPIV3-F1 HPIV3-R1	HN	884-905 966-986	+ -	ACTCCCAAAGTTGATGAAAAGAT TAAATCTTGTTGTTGAGATTGA	102
Influenza A	FLUA-F1 FLUA-R1	NS1	467-486 637-656	+ -	CTAAGGGCTTTCACCGAAGA CCCATTCTCATTACTGCTTC	192
Influenza B	FLUB-F1 FLUB-R1	NS1	746-755 967-986	+ -	ATGGCCATCGGATCCTCAAC TGTCAGCTATTATGGAGCTG	241
Adenovírus	ADENO-F1 ADENO-R1	Hexon		+ -	CCC(AC)TT(CT)AACCACCACCG ACATCCTT(GCT)C(GT)GAAGTTCCA	167
HMPV	MPV-F1 MPV-R1	F		+ -	GAGCAAATTGAAAATCCCAGACA GAAAACCTGCCGCACAACATTTAG	347

Para análise dos resultados, os casos foram divididos em grupos segundo a presença de infecção por um único agente (IU) ou por dois ou mais agentes virais (CI).

Foram também realizadas comparações segundo o vírus identificado e as associações virais presentes.

As análises de gravidade foram realizadas com correção estatística para a presença de outros fatores prognósticos pesquisados como idade, antecedentes e presença de comorbidades.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas foram analisadas por meio do teste de qui quadrado e teste exato de Fisher, quando necessário. As comparações entre variáveis contínuas foram feitas pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ou teste t de Student e as comparações não paramétricas foram feitas pelo teste de Kruskal Wallis ou teste U de Withney. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1. Vírus identificados

Foram identificados agentes virais na secreção respiratória de 219 das 304 crianças incluídas no estudo (72%). Destas, 158 (72%) apresentaram infecção por um único agente viral e compuseram o grupo infecção única (IU) e 61 (28%) apresentaram coinfeções (CI). No grupo com coinfeções, 50 (82%) crianças tiveram dois vírus identificados e 11 (18%) tiveram três vírus identificados.

O VSR foi o agente mais identificado no grupo IU assim como no grupo CI. No grupo IU o VSR esteve presente em 121 amostras (76,6%), seguido do AdV em 20 amostras (12,6%) e pelo MPV-h em 11 amostras (7%). No grupo CI, o VSR esteve presente em 54 crianças (88%) sendo a associação com o AdV a mais frequente em 24 amostras (39%), seguida da associação VSR/MPV-h em 16 amostras (26%).

A distribuição quanto aos agentes virais identificados está representada nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Distribuição dos agentes virais identificados no grupo infecção única (IU)

Vírus identificado	n	%
VSR	121	76,6
AdV	20	12,6
MPV-h	11	7
Flu A	3	2
PIV 3	2	1,2
PIV 1	1	0,6
TOTAL	158	100

Tabela 3 - Distribuição dos agentes virais identificados por no grupo coinfeção (CI)

Vírus identificado	n	%
VSR + AdV	24	39,3
VSR + MPV-h	16	26,2
VSR + MPV-h + AdV	5	8,2
VSR + Flu A	4	6,6
VSR + PIV 3	3	5
AdV + MPV-h + Flu A	2	3,3
VSR + Flu A + AdV	1	1,6
AdV + Flu A + PIV	1	1,6
AdV + MPV-h	1	1,6
AdV + MPV-h + PIV 3	1	1,6
VSR + PIV 2	1	1,6
VSR + MPV-h + PIV 3	1	1,6
AdV + PIV 3	1	1,6
TOTAL	61	100

A distribuição das infecções virais, segundo o mês de ocorrência, foi semelhante nos grupos IU e CI, predominando nos meses de abril, maio e junho (Gráfico 1). Tanto no mês de abril como no mês de maio, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos IU e CI ($p=0,21$).

Gráfico 1. Distribuição sazonal e da porcentagem mensal das amostras positivas para infecção única (IU) em relação ao total das amostras do grupo infecção única e porcentagem mensal das amostras positivas para coinfeção (CI) em relação ao total das amostras do grupo coinfeção

O VRS foi o vírus mais prevalente nos meses de abril, maio e junho. A CI por VRS e AdV foi mais prevalente no mês de maio, como mostrado no Gráfico 2.

Gráfico 2. Distribuição mensal dos agentes virais mais prevalentes do grupo infecção única (IU) e coinfecção (CI).

4.2 Características demográficas, antecedentes e comorbidades

Do total das 219 crianças com vírus respiratório positivo na secreção de nasofaringe, 82 (37,4%) tinham menos de 3 meses de idade, 105 (47,9%) entre 3 meses e 1 ano de idade e 32 (14,6%) tinham entre 1 ano e 2 anos de idade. Tanto a prevalência das infecções virais únicas como das coinfecções foi maior nas crianças menores de 1 ano, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição por faixa etária nos grupos infecção única (IU) e coinfeção (CI)

Idade	IU		CI	
	n	%	n	%
< 3 meses	57	36,1	25	41
3 a 12 meses	80	50,6	25	41
12 a 24 meses	21	13,3	11	18

* Utilizado teste qui-quadrado

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos IU e CI quanto à idade ($p=0,66$), sexo ($p=0,84$), história de prematuridade ($p=0,87$) e história de aleitamento materno até os 6 meses de idade ($p= 0,36$), como observado na Tabela 5.

A informação sobre aleitamento materno constou em 83,5% dos prontuários e as informações sobre as demais características e antecedentes constaram em 100% dos casos.

Tabela 5 – Características e antecedentes dos pacientes nos grupos infecção única (IU) e coinfeção (CI)

Variáveis	Grupo IU n= 158	Grupo CI n= 61	p
Sexo masculino	93 (58,9%)	35 (57,4%)	0,84
Mediana Idade (Q1-Q3)	5,1 (1,7 - 8,9)	4,6 (1,6 - 9,5)	0,40
Prematuridade	20 (12,7%)	13 (21,3%)	0,87
Aleitamento Materno até os 6 meses	34 (21,7%)	18 (29,5%)	0,36

A prevalência de doença pulmonar crônica (DPC) foi baixa em ambos os grupos: dois casos no grupo IU e dois no grupo CI. Também foi pequena a prevalência de cardiopatias: sete casos no grupo IU e quatro no grupo CI.

4.3 Apresentação clínica e diagnósticos

Os sinais e sintomas clínicos admissionais mais frequentes foram: tosse, febre, chiado no peito e dispnéia. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos IU e CI, como mostra a Tabela 6.

A informação sobre alguns sinais e sintomas, constou em parte reduzida dos prontuários o que prejudicou a sua análise. Entre estes: espirros, conjuntivite, obstrução nasal. As informações sobre os demais sinais e sintomas constaram em mais de 90% dos casos

Tabela 6 - Comparação dos principais sinais e sintomas clínicos admissionais nos grupos infecção única (IU) e coinfeção (CI)

Sinais e Sintomas			n (%)	p
Tosse	Grupo	IU	146 (92,4)	0,56
		CI	58 (95,1)	
Febre	Grupo	IU	101 (63,9)	0,50
		CI	36 (59)	
Chiado	Grupo	IU	149 (94,3)	0,05
		CI	61 (100)	
Dispneia	Grupo	IU	138 (87,3)	0,09
		CI	58 (95,1)	

* Utilizado teste qui-quadrado

O diagnóstico mais frequente em ambos os grupos foi a bronquiolite. Os diagnósticos mais frequentes no grupo IU e CI foram semelhantes e suas distribuições estão representadas no Gráfico 3.

Gráfico 3. Diagnósticos prevalentes do grupo infecção única (IU) e coinfeção (CI)

BQL: bronquiolite

PN: pneumonia

4.4. Desfechos de gravidade

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à necessidade de internação na UTI, necessidade de uso de oxigênio e necessidade de ventilação mecânica quando comparadas as crianças com IU em relação às crianças com CI. A comparação está representada na Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação entre a necessidade de internação na UTI, necessidade de uso de oxigênio e necessidade de ventilação mecânica entre os grupos infecção única (IU) e coinfeção (CI)

Variáveis			n (%)	p
Necessidade de UTI	Grupo	IU	45 (28,5%)	0,12
		CI	24 (39,30%)	
Necessidade de oxigênio	Grupo	IU	152 (96,2%)	0,71
		CI	58 (95,10%)	
Necessidade de Ventilação mecânica	Grupo	IU	23 (14,60%)	0,35
		CI	12 (19,70%)	

* Utilizado teste qui-quadrado

Também não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de internação, dias de internação em UTI, tempo de ventilação mecânica e dias do uso de oxigênio nos dois grupos, como observado na Tabela 8.

Tabela 8 - Comparação entre os desfechos de gravidade entre os grupos infecção única (IU) e coinfeção (CI)

Variáveis			Mediana (Q1-Q3)	p
Tempo de internação (dias)	Grupo	IU	8 (6 – 11)	0,18
		CI	9 (6 – 12)	
Tempo de UTI (dias)	Grupo	IU	4 (2,5 – 9,5)	0,8
		CI	5 (2,25 – 8)	
Tempo de Ventilação Mecânica (dias)	Grupo	IU	5 (3 – 7)	0,8
		CI	5,5 (3,25 – 12)	
Tempo de oxigênio (dias)	Grupo	IU	5 (3 – 7)	0,81
		CI	5 (3 – 7)	

*Utilizado teste de Mann-Whitney

Foi realizada a análise dos desfechos de gravidade em relação aos agentes etiológicos mais frequentemente identificados.

Quando comparada a infecção pelo VSR e as coinfeções entre o VSR e os outros sete vírus pesquisados (AdV, MPV-h, PIV 1, 2 e 3 e IV A e IV B) não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em relação aos desfechos de gravidade, como demonstrado nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 – Comparação entre os grupos infecção única (IU) por VSR e coinfecção (CI) entre VSR e outros vírus em relação necessidade de internação em UTI, necessidade de ventilação mecânica e necessidade de oxigênio

Variáveis	Infecções	n(%)	p
Necessidade internação na UTI	VSR	35 (28,9%)	0,22
	VSR + 7 outros vírus	21 (38,2%)	
Necessidade de ventilação mecânica	VSR	17 (14%)	0,50
	VSR + 7 outros vírus	10 (18,2%)	
Necessidade de oxigênio	VSR	117 (96,7%)	1
	VSR + 7 outros vírus	54 (98,2%)	

* Utilizado teste qui-quadrado

Tabela 10 – Comparação entre os grupos infecção única (IU) por VSR e coinfecção (CI) entre VSR e outros vírus em relação ao tempo de internação, tempo de internação na UTI, tempo de ventilação mecânica e dias de uso de oxigênio

Variáveis	Infecções	n	Mediana em dias (Q1-Q3)	p
Tempo de internação (dias)	de VSR	121	8 (6-10)	0,22
	VSR + 7 outros vírus	55	8 (6-12)	
Tempo de internação na UTI (dias)	de VSR	35	4 (3-9)	0,75
	VSR + 7 outros vírus	21	6 (2-8)	
Tempo de ventilação mecânica (dias)	de VSR	17	5 (4-7)	0,66
	VSR + 7 outros vírus	10	6 (5-14)	
Uso de oxigênio (dias)	de VSR	117	5 (3-7)	0,91
	VSR + 7 outros vírus	54	5 (3-7)	

*Utilizado teste de Mann-Whitney

O mesmo foi observado em relação ao AdV isoladamente (segundo vírus mais prevalente), e a coinfecção envolvendo este agente viral. Não houve diferença estatisticamente significativa nos desfechos de gravidade, como apresentado nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Comparação entre os grupos infecção única (IU) por adenovírus (AdV) e coinfecção (CI) entre adenovírus (AdV) e outros vírus em relação necessidade de internação em UTI, necessidade de ventilação mecânica e necessidade de oxigênio

Variáveis	Infecções	n(%)	p
Necessidade de internação na UTI	de AdV	7 (31,2%)	0,77
	AdV + 7 outros vírus	15 (39,3%)	
Necessidade de ventilação mecânica	de AdV	5 (25%)	1
	AdV + 7 outros vírus	8 (23,2%)	
Necessidade de oxigênio	de AdV	18 (90%)	1
	AdV+ 7 outros vírus	33 (91,1%)	

* Utilizado teste qui-quadrado

Tabela 12 - Comparação entre os grupos infecção única (IU) por adenovírus (AdV) e coinfecção (CI) entre adenovírus (AdV) e outros vírus em relação ao tempo de internação, tempo de internação na UTI, tempo de ventilação mecânica e dias de uso de oxigênio

Variáveis	Infecções	n	Mediana em dias (Q1-Q3)	p
Tempo internação (dias)	de AdV	20	10 (7-14)	0,91
	AdV + 7 outros vírus	36	9,5 (6-14,5)	
Tempo internação na UTI (dias)	de AdV	7	3 (2-9)	0,28
	AdV + 7 outros vírus	15	5 (3-11)	
Tempo ventilação mecânica (dias)	de AdV	5	3 (2-5)	0,11
	AdV + 7 outros vírus	8	5,5 (3,5-10,5)	
Uso oxigênio (dias)	de AdV	18	4 (3-6)	0,24
	AdV + 7 outros vírus	33	5 (3-8)	

* Utilizado teste de Mann-Whitney

Em relação à análise da comparação entre os subgrupos etiológicos das infecções únicas e das coinfecções mais prevalentes, os resultados ficam limitados devido ao tamanho pequeno das amostras. Devido a isso, foram consideradas as infecções mais prevalentes. Das IU mais prevalentes destacaram-se as infecções por VSR, AdV e MPV-h. No grupo CI foram mais prevalentes as associação entre VSR e AdV e entre VSR e MPV-h. A comparação entre os grupos não mostrou diferença estatisticamente

significante entre os desfechos de gravidade como apresentado nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13 - Comparação entre os grupos infecção única (IU) e coinfeção (CI) em relação necessidade de internação em UTI, necessidade de ventilação mecânica e necessidade de oxigênio

Variáveis	Infecções	n (%)	p
Necessidade de internação na UTI	VSR	35 (28,9%)	0,90
	AdV	7 (31,2%)	
	MPV-h	3 (35%)	
	VSR + AdV	9 (30,7%)	
	VSR + MPV-h	5 (37,5%)	
Necessidade de ventilação mecânica	VSR	17 (14%)	0,75
	AdV	5 (25%)	
	MPV-h	1 (9,1%)	
	VSR + AdV	3 (12,5%)	
	VSR + MPV-h	2 (12,5%)	
Necessidade de oxigênio	VSR	117 (96,7%)	0,48
	AdV	18 (90%)	
	MPV-h	11 (100%)	
	VSR + AdV	23 (95,8%)	
	VSR + MPV-h	16 (100%)	

* Utilizado teste qui-quadrado

Tabela 14 - Comparação entre os grupos infecção única (IU) e coinfeção (CI) em relação ao tempo de internação, tempo de internação na UTI, tempo de ventilação mecânica e dias de uso de oxigênio

Variáveis	Infecções	n	Mediana em dias (Q1-Q3)	p
Tempo de internação (dias)	VSR	121	8 (6-10)	0,42
	AdV	20	10 (7-14)	
	MPV-h	11	8 (6-13)	
	VRS + AdV	24	9 (6-13)	
	VRS + MPV-h	16	8 (6,5-10)	
Tempo de internação na UTI (dias)	VSR	35	4 (3-9)	0,87
	AdV	7	3 (2-9)	
	MPV-h	3	3 (1-17)	
	VSR + AdV	9	4 (3-11)	
	VSR + MPV-h	5	7 (2-8)	
Tempo de ventilação mecânica (dias)	VSR	17	5 (4-7)	0,10
	AdV	5	3 (2-5)	
	MPV-h	1	10 (10-10)	
	VSR + AdV	3	6 (6-53)	
	VSR + MPV-h	2	10 (6-14)	
Uso de oxigênio (dias)	VSR	117	5 (3-7)	0,48
	AdV	18	4 (3-6)	
	MPV-h	11	6 (5-9)	
	VSR + AdV	23	5 (4-8)	
	VSR + MPV-h	16	5 (4-6,5)	

* Utilizado teste de Kruskal-Wallis

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

As infecções respiratórias virais são comuns em lactentes hospitalizados com doença aguda do aparelho respiratório inferior. A casuística deste estudo foi composta por lactentes com idade, predominantemente, abaixo de 1 ano, diagnóstico de bronquiolite e pneumonia e acometidos por quadro respiratório, especialmente, durante os meses de estação dos vírus respiratórios mais frequentes. Estas características contribuíram para a alta taxa de detecção de vírus respiratórios em secreção de nasofaringe desses pacientes.

Este estudo pesquisou oito vírus respiratórios através da técnica de PCR ou RT-PCR o que, também, conferiu alta sensibilidade diagnóstica, com positividade em 72% das amostras. Este achado está de acordo com a literatura, que refere uma taxa de identificação viral, quando estes métodos são utilizados, em torno de 45 a 70%^{5,50}.

De fato, as taxas de detecção viral variam em acordo com a população estudada, especialmente no que se refere a idade, estação do ano e técnica de detecção viral³. Em estudos anteriores realizados no Hospital Universitário da USP, que utilizaram as mesmas técnicas laboratoriais, foram relatadas taxas menores de detecção viral (55%) em crianças hospitalizadas por problemas respiratórios, porém com idade até 5 anos. Este mesmo grupo de pesquisadores relatou apenas 3% de positividade em crianças com idade até 15 anos hospitalizadas por quaisquer diagnósticos¹⁸.

No presente estudo, as infecções por um único agente viral predominaram em relação às coinfeções virais (72% x 28%, respectivamente), como frequentemente relatado em estudos anteriores. Jennings e cols⁴⁵ por meio da associação de imunofluorescência, cultura viral e PCR, encontrou 70% de infecções únicas e 30% de coinfeções. Também, Stemple e cols⁴⁹ e Calvo e cols⁵⁶ identificaram um único agente viral em 76% e 83% das amostras e dois ou mais vírus em 24% e 17% das amostras, respectivamente.

O VSR é, habitualmente, o vírus mais identificado em lactentes hospitalizados com infecção respiratória aguda, com uma prevalência que varia de 40 a 75%⁴⁹. Nossos resultados mostraram que o VSR esteve presente em 80% das amostras positivas e foi o agente mais frequente tanto em crianças com infecção por um único agente viral (76,6%) como nos casos de coinfeção (88%). Adenovirus e MPV-h foram os dois outros agentes virais mais identificados em infecções por agente único (12,6 % e 7 %, respectivamente). Em outros estudos, o AdV também tem sido identificado como o segundo vírus mais freqüente nas crianças hospitalizadas com IARI^{45,49,56}. Sua prevalência pode variar de 7 a 15%, dependendo do método de identificação viral empregado^{3,70,71}.

O MPV-h é também um agente importante de hospitalização de lactentes. Sua freqüência é variável, em geral, entre 8% a 16%, dependendo do enfoque dos vírus estudados nas amostras. Em diversos estudos de etiologia de IARI em crianças o MPV-h ocorre como o segundo ou terceiro agente mais prevalente^{48,60,72,73}. Em crianças de 0 a 59 meses de idade, internadas por IARI

no HU-USP nos anos de 2003 a 2006, foi observada uma variação na prevalência anual de MPV-h entre de 9 a 18%⁷⁴.

A detecção de mais de um agente viral em secreção de nasofaringe é assunto controverso, mundialmente. Em geral, são consideradas coinfeções quando os vírus envolvidos são conhecidamente patogênicos, como os analisados neste estudo^{5,44,46,49,51}.

A ocorrência de coinfeções por vírus respiratórios é variável. Na literatura, a maioria dos estudos relata uma taxa de CI ao redor de 15 a 30%^{5,33,45,49,50,51}.

Os resultados deste estudo mostram que 28% das crianças infectadas apresentaram coinfeção viral.

Os agentes virais responsáveis pelas coinfeções, em geral são os que, predominantemente, circulam e causam as infecções por um único agente, no período avaliado. Neste estudo, pelo menos um dos três agentes mais frequentes em infecções únicas (VSR, adenovirus e metapneumovirus) esteve presente em 100% das coinfeções. O VSR foi identificado em 90% das coinfeções. A associação de VSR e AdV foi a mais prevalente (39%), seguida do VSR e MPV-h (26%).

Os agentes envolvidos na infecção viral mista podem não ser os mesmos nos diferentes países estudados, mas o VSR geralmente está presente na maioria dos relatos científicos^{45,49}. Associações semelhantes às encontradas neste estudo foram mostradas por Stemple⁴⁹ que estudou crianças, 78% delas hospitalizadas, com idade inferior a dois anos no período de maior circulação

viral. Oito vírus respiratórios foram pesquisados por meio de PCR: VSR, PIV 1-4, IV A e B e AdV. A CI esteve presente em 23% das amostras, sendo a associação VSR/AdV a mais frequente (43%). Jennings e cols⁴⁵ também encontraram o Adv como o segundo agente viral mais associado à infecção mista em crianças hospitalizadas.

Outros estudos apresentaram resultados diferentes. Cilla e cols³³ estudaram crianças entre um e 35 meses hospitalizadas com sintomas respiratórios. Os agentes virais foram identificados por meio de PCR em secreção de nasofaringe. O vírus mais frequentemente encontrados em coinfeções foi o bocavírus (68,8%) e o VSR (50,7%). Nessa pesquisa, a taxa de coinfeção por AdV foi baixa (9%), diferentemente do presente estudo.

Existem, ainda, relatos da ocorrência de AdV como agente envolvido em CI, porém não em infecções únicas em crianças não hospitalizadas. Isso foi observado por Van der Zalm⁷⁵, em estudo de coorte prospectiva no qual a incidência de infecções por AdV foi baixa, apenas 5 casos (0,7%) em 668 amostras de secreção respiratória coletadas durante episódios de infecções respiratórias leves.

O significado clínico da coinfeção (CI) ainda é motivo de estudos na literatura, principalmente no que diz respeito à apresentação das formas mais graves da doença. Pouco se conhece atualmente sobre a etiopatogenia e os efeitos da interação da infecção por mais de um agente viral sobre o organismo da criança.

Vários fatores tem sido estudados como possíveis determinantes da gravidade das infecções respiratórias virais como os tipos e subtipos de vírus, as suas características estruturais, a quantidade de inóculo presente nas vias aéreas, a variação da resposta imunológica frente à infecção viral e a presença de agente único ou de codeteção de dois ou mais agentes virais^{32,76}.

O presente estudo procurou avaliar, primariamente, o prognóstico das coinfeções em comparação às infecções por agente único, mas também sua apresentação clínica inicial.

Os principais sinais e sintomas de apresentação clínica das coinfeções virais foram os mesmos dos casos de infecções por agente único: tosse, febre, chiado, e taquidispnéia. Ou seja, a apresentação clínica, por si só, não diferenciou a IU da CI.

Os diagnósticos encontrados são semelhantes aos de estudos anteriores que incluíram crianças hospitalizadas por infecções virais, sendo bronquiolite e pneumonia os mais frequentes^{3,4,5}.

Em quadros de afecções respiratórias agudas em lactentes hospitalizados, não é infrequente, após a reavaliação diária e realização de exames, a alteração do diagnóstico feito à entrada no serviço de emergência, especialmente no que diz respeito ao diagnóstico de broncopneumonia. Por este motivo, optou-se, neste estudo, pela análise dos diagnósticos de alta das crianças.

Os diagnósticos não diferiram entre os casos de coinfeções comparados às infecções por agente único: bronquiolite (42% x 33%, $p=0,22$),

broncopneumonia associada a chiado (30% x 30%, $p=0,97$), asma (15% x 16%, $p=0,82$) e bronquiolite associada a broncopneumonia (13% x 21%, $p=0,10$). Em outros estudos que compararam as IU e CI, a bronquiolite foi o diagnóstico mais frequente em ambos os grupos, seguido de pneumonia, bronquite e crupe^{59,77}.

Na análise comparativa, os fatores prognósticos conhecidos para maior gravidade distribuíram-se de forma homogênea em ambos os grupos, IU e CI. O sexo das crianças não diferenciou os grupos IU e CI. No estudo de Byeon⁷⁸ também não houve diferenças em relação ao sexo para infecção por VSR, AdV, PIV e IV, assim como, Ray e cols⁷⁷ não acharam diferenças entre os sexos quando comparadas infecções por VSR e por VSR associado a outros agentes.

Oitenta e cinco por cento da casuística do nosso estudo foi composta por crianças menores de um ano de idade. A idade de aquisição da infecção também foi semelhante em crianças com IU ou CI. A maioria dos autores encontraram dados semelhantes aos nossos. Jennings e cols⁴⁵ relatam idade mediana de 5 meses para IU e 6,5 meses para CI.

No entanto, alguns estudos evidenciaram diferenças na ocorrência de IU e CI segundo a idade. Ray e cols⁷⁷ constatou que as crianças menores de 6 meses tiveram uma tendência a ter mais coinfeções por VSR que infecções únicas por este agente, enquanto que entre 6 e 11 meses a taxa de coinfeção foi menor que a infecção única por VSR. Drews⁴⁴ demonstrou que a CI ocorreu mais que a IU em crianças menores de um ano de idade (25% vs 15%). No entanto, diferentemente desses estudos, Calvo⁵⁶ relatou que entre crianças internadas com idade abaixo de 24 meses, as portadoras de IU por VSR

apresentaram idade menor que as portadoras de coinfeções (6,2 meses vs 7,2 meses, respectivamente - $p=0,012$).

Entre os fatores prognósticos das infecções respiratórias virais, a prematuridade aumenta, consideravelmente, o risco de desenvolver doença grave. No presente estudo, a prevalência de prematuridade entre as crianças estudadas foi de 15%, o que se mostrou dentro do esperado segundo as características do serviço e de relatos da literatura internacional^{37,40}. Levantamento de dados, ainda não publicados, na divisão de clínica pediátrica do HU-USP mostrou que em anos anteriores a prevalência de prematuridade entre crianças hospitalizadas com infecção por VSR esteve em torno de 15 a 18% (comunicação pessoal).

Entre as crianças com IU e com CI as ocorrências de prematuridade foram semelhantes (13% x 21%, $p=0,87$), o que sugere que este antecedente não tenha sido determinante para a aquisição de IU ou CI. Esta distribuição homogênea indica também que esse fator não interferiu na análise da gravidade nos dois grupos IU e CI.

Em relação à presença de outras comorbidades como doença pulmonar crônica, cardiopatias congênitas, imunodeficiências e doenças neuromusculares, a amostra foi pequena, como esperado em um serviço de nível secundário de atenção à saúde. Isto impossibilitou a análise independente dessas condições, porém não interferiu na avaliação dos resultados comparativos entre IU e CI.

Este estudo analisou a gravidade clínica segundo a presença de infecção única ou coinfeção, corrigindo este efeito para a presença dos fatores de confusão acima discutidos: idade, sexo, antecedentes e presença de comorbidades. Não foram observadas diferenças entre os grupos IU e CI quanto aos desfechos de gravidade (dias de internação, necessidade e dias de UTI, necessidade e dias de ventilação mecânica, necessidades e dias de uso de oxigênio). Resultados semelhantes também foram encontrados por outros autores. Ray⁷⁷ observou que a bronquiolite causada por mais de um agente viral não foi mais grave daquela causada pelo VSR isoladamente, principalmente em relação ao mês de ocorrência, idade e duração da doença. Cilla³³ também não observou diferença entre a gravidade das crianças internadas com IU e CI, quando comparados tempo de internação, necessidade de UTI e necessidade de oxigênio. Wolf⁶⁰ também observou que a coinfeção com MPV-h não aumentou a gravidade da doença.

No entanto, alguns relatos na literatura divergem dos nossos achados e são controversos. Foram publicados estudos que sugerem maior gravidade nos casos de coinfeções virais e outros, contrariamente, conferem maior gravidade às infecções por um único agente. Greensill⁷⁹ estudou crianças em ventilação mecânica com bronquiolite por VSR, durante um ano. Foi coletada secreção do tubo traqueal e empregada a técnica de PCR para identificação de MPV-h. Setenta por cento das crianças com bronquiolite grave por VSR que necessitaram de ventilação mecânica apresentaram coinfeção com MPV-h,

sugerindo que a coinfeção VSR e MPV-h pode ser um determinante na gravidade da doença por VSR.

Semple e cols⁵⁸ através de um estudo retrospectivo realizado nos meses de inverno de 2001 e 2002, também sugeriram que a coinfeção entre MPV-h e VSR tenha aumentado a gravidade da doença com necessidade de internação em UTI e indicação de ventilação mecânica.

Por outro lado, Canducci⁵ relata maior gravidade de infecções únicas por VSR quando comparadas às coinfeções por VSR e MPV-h, em crianças hospitalizadas. As infecções únicas por VSR foram associadas a maior tempo de hospitalização e maior prevalência de hipóxia. O mesmo não foi observado quando comparada a infecção única por VSR e a coinfeção com qualquer outro patógeno.

Dentro da avaliação dos fatores possivelmente associados a gravidade foi realizada a análise do papel de cada agente viral em relação aos desfechos. As infecções por VSR como agente único tiveram evolução semelhante às coinfeções por VSR e outros vírus. O mesmo foi observado quando comparadas as infecções por Adv isoladamente e as coinfeções com Adv.

O impacto clínico da interação de diferentes agentes virais pode refletir a associação de diferentes mecanismos patogênicos utilizados por diferentes vírus. O presente estudo não teve por objetivo a análise da patogenia envolvida nas IU e CI, porém os resultados encontrados podem contribuir para a interpretação de achados patogênicos descritos na literatura.

Entre os pacientes aqui estudados, 95,9% necessitaram de oxigenioterapia durante a hospitalização e esta terapêutica foi igualmente utilizada por crianças com IU e com CI (96,2% x 95,1%, $p=0,71$). O tempo de utilização de oxigenioterapia também foi semelhante entre os grupos IU e CI (5 dias x 5 dias). Os níveis de saturação de oxigênio em ar ambiente, mensurados por oximetria de pulso, foram utilizados para a indicação da oxigenioterapia quando abaixo de 92% e para suspensão dessa terapêutica quando estabilizados acima deste nível^{10,80,81}.

No presente estudo, a gravidade do quadro clínico, avaliada tanto pela necessidade quanto pelo tempo de ventilação mecânica, também foi semelhante nos dois grupos comparados (14,6% x 19,7% $p=0,35$ e 5 dias x 5,5 dias $p=0,8$, respectivamente para IU e CI).

A taxa de ventilação mecânica de aproximadamente 15 a 20% encontrada nesta casuística é esperada segundo as características da população atendida na DCP e segundo dados internacionais. No estudo de Bont³⁶ é relatada necessidade de ventilação mecânica nas bronquiolites internadas entre 7 e 21%.

Este estudo não incluiu crianças com quadros leves, uma vez que a casuística foi direcionada para crianças hospitalizadas. Estudos anteriores compararam crianças hipóxicas e não hipóxicas. Garofalo⁸² comparou a produção de citocinas em crianças infectadas por VSR e IV. Foi relatada uma concentração de MIP 1 alfa - um quimiotático para eosinófilos importante para iniciar a resposta inflamatória à infecção pelo VSR - duas vezes maior nas

crianças com bronquiolite hipóxica causada pelo RSV e IV A, quando comparadas às crianças com quadros não hipóxicos.

Não há relatos de estudos que tenham comparado a produção de citocinas em casos de IU e CI.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Por se tratar de um estudo de coorte histórica, algumas limitações ocorreram pois são inerentes a este desenho de estudo. A imprecisão das informações presentes nos prontuários em relação a alguns sinais/sintomas e antecedentes não permitiram sua análise. Essas informações incluem dados sobre tabagismo passivo, frequência em creche, higiene ambiental, e antecedentes familiares de atopia.

Pelo fato de ser uma análise retrospectiva, os exames laboratoriais não foram incluídos pois estiveram presentes em parcelas desiguais entre os grupos, sem que estivessem esclarecidos os critérios que indicaram suas coletas.

As pesquisas de rinovírus, bocavírus e coronavírus não foram realizadas, pois não estavam disponíveis na época em que os casos foram hospitalizados. No entanto, os principais agentes virais responsáveis por infecções agudas do aparelho respiratório inferior em lactentes hospitalizados foram analisados.

Não foram incluídos casos leves de IU e CI não hospitalizados, portanto, os resultados não podem ser extrapolados para crianças acompanhadas

ambulatorialmente. Em estudo prospectivo realizado na Holanda, 18 crianças foram seguidas e submetidas a coleta de aspirado de nasofaringe para pesquisa viral a cada duas semanas. Dezesete por cento das crianças com múltiplos patógenos foram sintomáticas enquanto apenas 3% foram assintomáticas⁷⁵. A análise dos resultados do presente estudo não permite excluir a possibilidade de que a comparação de IU e CI em crianças com quadros leves atendidas ambulatorialmente seja diferente.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- As coinfeções por vírus respiratórios foram frequentes em lactentes hospitalizados com IARI e envolveram os agentes circulantes também causadores de infecções por um único agente.
- As características demográficas, a apresentação clínica, os diagnósticos, os antecedentes pessoais e a presença de comorbidades foram semelhantes entre crianças portadoras de infecções por um único agente e de coinfeções virais.
- A presença de dois ou mais vírus não conferiu diferenças à gravidade do quadro durante a internação, independentemente dos agentes etiológicos envolvidos e da presença de outros fatores prognósticos associados à infecção.

ANEXOS

7 – ANEXOS

Anexo A

PROTOCOLO

Nome

Data nascimento:

Sexo: ☐ M ☐ F

Cor:

RH:

☐ B

☐ P

☐ N

Procedência:

Data de admissão:

Local de admissão

☐ Pronto Socorro

☐ Enfermaria

☐ UTI

☐ Berçário

Diagnóstico de alta:

História Clínica	Sim	Não	Tempo de duração (dias)
Tosse			
Coriza			
Febre			
Obstrução nasal			
Espirros			
Chiado no peito			
Cansaço			
Conjuntivite			
Cianose			
Apnéia			
Peito cheio			
Vômitos pós tosse			
Contato com IVAS			
Imunização completa			
Vacinação Influenza			
Palivizumab			

Fatores de Risco:

☐ prematuridade IG: PN: Idade alta do berçário: O2 neonatal (forma/tempo)

☐ doença pulmonar crônica medicação:

☐ RGE medicação:

☐ cardiopatia congênita medicação:

☐ anomalia congênita de vias aéreas

☐ doença neuromuscular

☐ aleitamento materno exclusivo ☐ s ☐ n Idade do desmame:

☐ frequente creche ☐ s ☐ n

☐ tabagismo passivo ☐ s ☐ n

Número de fumantes no domicílio:

Grau de parentesco:

☐ Antecedente familiar com ☐ asma ☐ rinite ☐ TB ☐ atopia

☐ outros Grau de parentesco:

☐ animais de estimação ☐ poluição ambiental ☐ poeira ☐ mofo ☐ produtos químicos

Anexo B**PACIENTE HOSPITALIZADO**

RG:

Data da admissão: ____/____/____

Data da alta: ____/____/____

Diagnóstico da alta:

CONTROLE DIÁRIO DE PACIENTES HOSPITALIZADOS

	DATA	DATA	DATA	DATA	DATA	DATA
Local						
FR						
TEMP						
FC						
Ausculta						
Dispneia						
SAT O2						
O2 S/ V. MEC						
V. MEC/ V. NI						
ATB						
CE						
INALAÇÃO						
NUTRIÇÃO						
FISIOTERAPIA						
B2 endovenoso						
RX TORAX						
Droga Vasoativa						

Venturi	1	V.Mec	1	Jejum	1	SF	1
Máscara não reinalante	2	CPAP	2	Pausa	2	B2 inalatório	2
Oxitenda	3	EPAP	3	Oral	3	Metilprednisolona	3
Nebulização	4			Sonda	4	Prednisolona	4
Isolete	5			Parenteral	5	Prednisona	5
Capuz	6					BI	6
						Adrenalina	7
						Dexametasona	8

RX alterado	1	Ausculta alterada	1	Dispneia presente	1
RX normal	2	Ausculta normal	2	Dispneia ausente	2

REFERÊNCIAS

8- REFERÊNCIAS*

1. Rudan I, Tomaskovic L, Boschi-Pinto C, Campbell H; WHO Child Health Epidemiology Reference Group. Global estimate of the incidence of clinical pneumonia among children under five years of age. *Bull World Health Organ.* 2004 Dec;82(12):895-903.
2. Wardlaw T, Salama P, Johansson EW, Mason E. Pneumonia: the leading killer of children. *Lancet.* 2006 Sep 23;368(9541):1048-50.
3. Stralioatto SM, Siqueira MM, Machado V, Maia TM. Respiratory viruses in the pediatric intensive care unit: prevalence and clinical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004 Dec;99(8):883-7.
4. Rubin FM, Fischer GB. [Clinical and transcutaneous oxygen saturation characteristics in hospitalized infants with acute viral bronchiolitis. *JPediatr (Rio J).* 2003 Sep-Oct;79(5):435-42.
5. Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M, Marinozzi MC, Berrè S, Terulla C, Gargantini G, Cambieri P, Romero E, Clementi M. Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *J Med Virol.* 2008 Apr;80(4):716-23.
6. Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bull World Health Organ.* 2008 May;86(5):408-16.

7. Chang A B, Chang C C, Torzillo P J. Lower respiratory tract infections. *Pediatr Clin N Am*. 2009;56:1303-21.
8. Barson WJ. Epidemiology, pathogenesis, and etiology of pneumonia in children [internet]. Uptodate 2010 Jan [cited 2009, dec 7]. Available from: <http://www.uptodateonline.com>
9. Hall CB. Medical progress: Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med*. 2001;344(25):1917-1928
10. Coffman S. Late preterm infants and risk for RSV. *MCN Am J Matern Child Nurs*. 2009 Nov-Dec;34(6):378-84; quiz 385-6.
11. Barr FE, Graham BS. Clinical features and diagnosis of respiratory syncytial virus infection [internet]. Uptodate 2010 Jan [cited 2009, nov 2]. Available from: <http://www.uptodateonline.com>
12. Taussig LM, Wright AL, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Martinez FD. Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to present. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Apr;111(4):661-75.
13. Vieira SE, Stewien KE, Queiroz DA, Durigon EL, Török TJ, Anderson LJ, Miyao CR, Hein N, Botosso VF, Pahl MM, Gilio AE, Ejzenberg B, Okay Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001 May-Jun;43(3):125-31.
14. Pecchini R, Berezin EN, Felício MC, Passos SD, Souza MC, Lima LR, Ueda M, Matsumoto TK, Durigon EL. Incidence and clinical characteristics of the infection by the respiratory syncytial virus in children admitted in

- Santa Casa de São Paulo Hospital. *Braz J Infect Dis*. 2008 Dec;12(6):476-9.
15. Serafino RL, Gurgel RQ, Dove W, Hart CA, Cuevas LE. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus in children over two seasons with a high incidence of respiratory infections in Brazil. *Ann Trop Paediatr*. 2004 Sep;24(3):213-7.
 16. Moura FEA, Borges LC, Souza LSF. Estudo de infecções respiratórias agudas virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2003;39(4):275-82
 17. Crowe, JE. Human metapneumovirus infections [internet]. Uptodate 2010 Jan [cited 2009, dec 29]. Available from: <http://www.uptodateonline.com>
 18. Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DB, Golono MA, Gillio AE, Stwien KE, Erdman DD, Durigon EL. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2007 Sep-Oct;83(5):422-8.
 19. Caracciolo S, Minini C, Colombrita D, Rossi D, Miglietti N, Vettore E, Caruso A, Fiorentini S. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with acute respiratory tract disease: virologic and clinical features. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 May;27(5):406-12.
 20. Munoz FM. Parainfluenza viruses in children [internet]. Uptodate 2010 Jan [cited 2009, may 7]. Available from: www.uptodateonline.com

21. Hall CB. Clinical features and diagnosis of influenza in children [internet]. Uptodate 2010 Jan [cited 2010, jan 26]. Available from:
<http://www.uptodateonline.com>
22. Reed C, Kallen AJ, Patton M, Arnold KE, Farley MM, Hageman J, Finelli L. Infection with community-onset *Staphylococcus aureus* and influenza virus in hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 Jul;28(7):572-6.
23. Finelli L, Fiore A, Dhara R, Brammer L, Shay DK, Kamimoto L, Fry A, Hageman J, Gorwitz R, Bresee J, Uyeki T. Influenza-associated pediatric mortality in the United States: increase of *Staphylococcus aureus* coinfection. *Pediatrics*. 2008 Oct;122(4):805-11.
24. Flomenberg P. Epidemiology and clinical manifestations of adenovirus infection [internet]. Uptodate 2010 Jan [cited 2010, jan 26]. Available from:
<http://www.uptodateonline.com>
25. Hay CM. Microbiology and pathogenesis of rhinovirus infections [internet]. 2007 Aug [cited 2007, may 21]. Available from:
<http://www.uptodateonline.com>
26. Munoz FM. Epidemiology and clinical manifestations of rhinovirus infections in children [internet]. Uptodate 2010 Jan [cited 2007, mar 1]. Available from: <http://www.uptodateonline.com>
27. Hay CM. Coronaviruses [internet]. Uptodate 2007 Aug [cited 2006, dec 11]. Available from <http://www.uptodateonline.com>

28. Heugel J, Martin ET, Kuypers J, Englund JA. Coronavirus-associated pneumonia in previously healthy children. *Pediatr Infect Dis J*. 2007 Aug;26(8):753-5.
29. Brieu N, Guyon G, Rodière M, Segondy M, Foulongne V. Human bocavirus infection in children with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Nov;27(11):969-73.
30. Bastien N, Chui N, Robinson JL, Lee BE, Dust K, Hart L, Li Y. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *J Clin Microbiol*. 2007 Feb;45(2):610-3.
31. Calvo C, García-García ML, Pozo F, Carvajal O, Pérez-Breña P, Casas I. Clinical characteristics of human bocavirus infections compared with other respiratory viruses in Spanish children. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Aug;27(8):677-80.
32. DeVincenzo JP. Factors predicting childhood respiratory syncytial virus severity: what they indicate about pathogenesis. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Nov;24(11 Suppl):S177-83.
33. Cilla G, Oñate E, Perez-Yaarza E G, MOntes M, Vicente D, Prez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: high rate of viral coinfection. *J Med Virol*. 2008;80:1843-1849.
34. Welliver RC Sr. The immune response to respiratory syncytial virus infection: friend or foe? *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008 Apr;34(2):163-73.

35. Martinez FD, Morgan WJ, Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM. Diminished lung function as a predisposing factor for wheezing respiratory illness in infants. *N Engl J Med*. 1988 Oct 27;319(17):1112-7.
36. Bont L, Kimpen JL. Immunological mechanisms of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Intensive Care Med*. 2002 May;28(5):616-21.
37. Boyce TG, Mellen BG, Mitchel EF Jr, Wright PF, Griffin MR. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. *J Pediatr*. 2000 Dec;137(6):865-70.
38. Meissner HC. Selected populations at increased risk from respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2003 Feb;22(2 Suppl):S40-4
39. Simoes EA, Carbonell-Estrany X. Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries. *Pediatr Infect Dis J*. 2003 Feb;22(2 Suppl):S13-8
40. Wang EE, Law BJ, Boucher FD, Stephens D, Robinson JL, Dobson S, Langley JM, McDonald J, MacDonald NE, Mitchell I. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study of admission and management variation in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. *J Pediatr*. 1996 Sep;129(3):390-5.
41. Peltola VT, McCullers JA. Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Jan;23(1Suppl):S87-97.

42. Jakab GJ. Immune impairment of alveolar macrophage phagocytosis during influenza virus pneumonia. *Am Rev Respir Dis.* 1982 Nov;126(5):778-82.
43. Paranhos-Baccalà G, Komurian-Pradel F, Richard N, Vernet G, Lina B, Floret D. Mixed respiratory virus infections. *J Clin Virol.* 2008 Dec;43(4):407-10.
44. Drews AL, Atmar RL, Glezen WP, Baxter BD, Piedra PA, Greenberg SB. Dual respiratory virus infections. *Clin Infect Dis.* 1997 Dec;25(6):1421-9.
45. Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 Nov;23(11):1003-7.
46. Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, Adams O. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Jul;27(7):589-94.
47. Aberle JH, Aberle SW, Pracher E, Hutter HP, Kundi M, Popow-Kraupp T. Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on clinical course of disease and interferon-gamma response. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 Jul;24(7):605-10.
48. Richard N, Komurian-Pradel F, Javouhey E, Perret M, Rajoharison A, Bagnaud A, Billaud G, Vernet G, Lina B, Floret D, Paranhos-Baccalà G. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric

- intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Mar;27(3):213-7.
49. Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr*. 2009 Jan;98(1):123-6.
50. van der Zalm MM, Uiterwaal CS, Wilbrink B, de Jong BM, Verheij TJ, Kimpen JL, van der Ent CK. Respiratory pathogens in respiratory tract illnesses during the first year of life: a birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 Jun;28(6):472-6.
51. Peng D, Zhao D, Liu J, Wang X, Yang K, Xicheng H, Li Y, Wang F. Multipathogen infections in hospitalized children with acute respiratory infections. *Virology*. 2009 Sep 29;6:155.
52. Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, Gourgiotis D, Kafetzis D. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 May ;165(9):1285-9.
53. van Woensel JB, Bos AP, Lutter R, Rossen JW, Schuurman R. Absence of human metapneumovirus co-infection in cases of severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Pulmonol*. 2006 Sep;41(9):872-4.
54. McNamara PS, Flanagan BF, Smyth RL, Hart CA. Impact of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus co-infection in severe bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol*. 2007 Aug;42(8):740-3.

55. Kaida A, Kubo H, Goto K, Shiomi M, Kohdera U, Iritani N. Co-infection of human metapneumovirus with adenovirus or respiratory syncytial virus among children in Japan. *Microbiol Immunol*. 2007;51(7):679-83.
56. Calvo C, García-García ML, Blanco C, Vázquez MC, Frías ME, Pérez-Breña P, Casas I. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *J Clin Virol*. 2008 Jul;42(3):268-72.
57. Pitrez PMC, Stein RT, Stuermer L, Macedo IS, Schmitt VM, Jones, MH, Arruda E. Bronquiolite aguda por rinovírus em lactentes jovens. *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81(5):417-20.
58. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, Shears P, Smyth RL, Hart CA. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2005 Feb 1;191(3):382-6.
59. Subbarao EK, Griffis J, Waner JL. Detection of multiple viral agents in nasopharyngeal specimens yielding respiratory syncytial virus (RSV). Na assessment of diagnostic strategy and clinical significance. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1989 Jul-Aug;12(4):327-32.
60. Wolf DG, Greenberg D, Kalkstein D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Saleh N, Goldberg MD, Dagan R. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract

- infections in hospitalized young children. *Pediatr Infect Dis J*. 2006 Apr;25(4):320-4.
61. Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2003 Dec;9(12):1626-8.
62. Aberle JH, Aberle SW, Rebhandl W, Pracher E, Kundi M, Popow-Kraupp T. Decreased interferon-gamma response in respiratory syncytial virus compared to other respiratory viral infections in infants. *Clin Exp Immunol*. 2004 Jul;137(1):146-50.
63. Aberle JH, Aberle SW, Dworzak MN, Mandl CW, Rebhandl W, Vollnhofer G, Kundi M, Popow-Kraupp T. Reduced interferon-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells of infants with severe respiratory syncytial virus disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Oct;160(4):1263-8.
64. Díaz PV, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendaño LF, Gaggero A, Simon V, Arredondo SM, Pinto R, Díaz A. Differential effects of respiratory syncytial virus and adenovirus on mononuclear cell cytokine responses. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Oct;160(4):1157-64.
65. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Sep 15;168(6):633-9.
66. Joshi P, Shaw A, Kakakios A, Isaacs D. Interferon-gamma levels in nasopharyngeal secretions of infants with respiratory syncytial virus and

- other respiratory viral infections. *Clin Exp Immunol*. 2003 Jan;131(1):143-7.
67. Lebel MH, Gauthier M, Lacroix J, Rousseau E, Buithieu M. Respiratory failure and mechanical ventilation in severe bronchiolitis. *Arch Dis Child*. 1989 Oct;64(10):1431-7.
68. Jartti T, Lee WM, Pappas T, Evans M, Lemanske RF Jr, Gern JE. Serial viral infections in infants with recurrent respiratory illnesses. *Eur Respir J*. 2008 Aug;32(2):314-20.
69. Legg JP, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Frequency of detection of picornaviruses and seven other respiratory pathogens in infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Jul;24(7):611-6.
70. Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxovirus, coronaviruses and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol*. 2006;78:1232-1240
71. Kuypers J, Martin ET, Heugel J, Wright N, Morrow R, Englund JA. Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes. *Pediatrics*. 2007 Jan;119(1):e70-6.
72. Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, Tsolia M, Gourgiotis D, Liapi-Adamidou G, Constantopoulos AG, Kafetzis D, Papadopoulos NG. Human Metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. *J Clin Virol*. 2004 Jul;30(3):267-70.

73. Foulongne V, Guyon G, Rodière M, Segondy M. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2006 Apr;25(4):354-9.
74. Oliveira DBL. *Epidemiologia e caracterização molecular do metapneumovírus humano na cidade de São Paulo, Brasil (2003-2006)* [tese]. São Paulo: Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.
75. van der Zalm MM, van Ewijk BE, Wilbrink B, Uiterwaal CS, Wolfs TF, van der Ent CK. Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. *J Pediatr*. 2009 Mar;154(3):396-400, 400.e1.
76. Martin ET, Kuypers J, Heugel J, Englund JA. Clinical disease and viral load in children infected with respiratory syncytial virus or human metapneumovirus. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Dec;62(4):382-8.
77. Ray CG, Minnich LL, Holberg CJ, Shehab ZM, Wright AL, Barton LL, Taussig LM. Respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses: possible influence of other agents. The Group Health Medical Associates. *Pediatr Infect Dis J*. 1993 Jan;12(1):15-9.
78. Byeon JH, Lee JC, Choi IS, Yoo Y, Park SH, Choung JT. Comparison of cytokine responses in nasopharyngeal aspirates from children with viral lower respiratory tract infections. *Acta Paediatr*. 2009 Apr;98(4):725-30.
79. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis*. 2003 Mar;9(3):372-5.

80. Zorc JJ, Hall CB. Bronchiolitis: recent evidence on diagnosis and management. *Pediatrics*. 2010 Feb;125(2):342-9.
81. Panitch HB. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: supportive care and therapies designed to overcome airway obstruction. *Pediatr Infect Dis J*. 2003 Feb;22(2 Suppl):S83-7.
82. Garofalo RP, Hintz KH, Hill V, Patti J, Ogra PL, Welliver RC Sr. A comparison of epidemiologic and immunologic features of bronchiolitis caused by influenza virus and respiratory syncytial virus. *J Med Virol*. 2005 Feb;75(2):282-9.

* De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.
Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.