Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo

Autorizo a divulgação desta Dissertação na
Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP

.....

São Paulo
2010

Milena Siciliano Nascimento – Dissertação (Mestrado) - SP - 2010

MILENA SICILIANO NASCIMENTO

**Bronquiolite viral aguda: etiologia e impacto clínico imediato e tardio em
pacientes atendidos em um hospital privado de São Paulo.**

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

Área de concentração: Pediatria
Orientador: Dr Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva
Filho

São Paulo
2010

MILENA SICILIANO NASCIMENTO

**Bronquiolite viral aguda: etiologia e
impacto clínico imediato e tardio em
pacientes atendidos em um hospital
privado de São Paulo**

São Paulo
2010

MILENA SICILIANO NASCIMENTO

**Bronquiolite viral aguda: etiologia e impacto clínico
imediate e tardio em pacientes atendidos em um hospital
privado de São Paulo**

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

Área de concentração: Pediatria

Orientador: Dr Luiz Vicente
Ribeiro Ferreira da Silva Filho

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

Nascimento, Milena Siciliano

Bronquiolite viral aguda : etiologia e impacto clínico imediato e tardio em
pacientes atendidos em um hospital privado de São Paulo / Milena Siciliano
Nascimento. -- São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Pediatria.

Orientador: Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho.

Descritores: 1.Bronquiolite 2.Vírus 3.Hospitalização 4.Sons respiratórios

USP/FM/SBD-008/10

Dedico esta dissertação às minhas filhas Júlia e Gabriela por darem sentido à minha vida e ao meu marido Alexandre, por me encher de amor e fazer com que eu busque sempre ser uma pessoa melhor.

Agradeço a minha mãe, Zezé, por toda palavra de conforto e ânimo nos momentos em que parecia não ter mais forças para continuar. Você é a minha grande amiga, minha fonte de energia.

Agradeço a minha irmã, Giovana, por sempre se preocupar com meus problemas e por estar sempre pronta a me ajudar a resolvê-los. Amo você.

Agradeço a minha sogra, Marilda, por tanta dedicação e carinho com minhas filhas não só neste período do mestrado, mas em todos os momentos da nossa vida. Você é muito especial, obrigada por tudo.

Agradeço ao meu sogro, José, por tanto empenho em elaborar minhas planilhas do banco de dados. Acho que vocês não têm idéia do quanto elas foram utilizadas ao longo do trabalho. Obrigada querido.

Agradeço aos meus queridos amigos: Ivone, Tio Lauro e Dra Lúcia por sempre me mostrarem o melhor caminho a seguir. Com a presença de vocês a vida fica muito mais fácil.

Agradeço às minhas amigas do HIAE, Vanessa, Valéria, Giselle, Renata, Ana Paula e Luciana que sempre estavam prontas a me ajudar na coleta das amostras e muitas vezes se desdobravam para resolver problemas quando eu não estava presente.

Agradeço a toda equipe de fisioterapia da materno-infantil pela força, pela amizade, pelo companheirismo. Quero que saibam que é muito bom trabalhar com pessoas tão especiais, pessoas que podemos contar a qualquer hora.

Agradeço a todos os pediatras da UPA que, mesmo em plantões tumultuados, achavam tempo para incluir pacientes no trabalho e preencher todos os questionários com perfeição.

Agradeço a todos os enfermeiros e técnicos de enfermagem da UPA que tanto me ajudaram com a condução deste trabalho.

Agradeço às meninas do laboratório: Andréa, Marta e Tânia pela boa vontade em me receber e pelo minucioso trabalho realizado com as amostras.

Agradeço ao Instituto de Ensino e Pesquisa do HIAE que viabilizou os recursos necessários para realização deste trabalho.

Agradeço a minha querida amiga e eterna professora, Maria de Lourdes Corradi da Silva, por despertar em mim o interesse pela pesquisa e por sempre torcer pelo meu sucesso.

Agradeço ao meu orientador, Luiz Vicente (Vic), pela sua presença constante, pela preocupação com meu desenvolvimento, pela grande ajuda durante todos estes anos, por tornar possível o meu sonho de ser mestre.

“Somente uma vida vivida para os outros, é uma vida que vale a pena”.

Em memória Dr Lauro Gonçalves.

RESUMO

Nascimento, M.S. **Bronquiolite viral aguda: etiologia e impacto clínico imediato e tardio em pacientes atendidos em um hospital privado de São Paulo.** 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Bronquiolite viral aguda é mundialmente a doença de vias aéreas inferiores mais comum entre lactentes e crianças jovens, sendo uma das principais causas de hospitalização na infância. Um grupo específico de crianças tem risco aumentado para desenvolver quadros mais graves sendo que os principais fatores de risco associados são: idade, sexo, co-morbidades (prematuridade, presença de displasia broncopulmonar e cardiopatia congênita, imunodeficiência), fatores ambientais e socioeconômicos e história de atopia familiar. Os principais agentes etiológicos associados a bronquiolite são o vírus sincicial respiratório (VSR); influenza A e B; parainfluenza 1, 2 e 3 e adenovírus, picornavírus, coronavírus e metapneumovírus humano. O objetivo deste estudo foi avaliar a etiologia e o impacto clínico de infecções por vírus respiratórios em lactentes com idade entre 0 a 2 anos durante o primeiro episódio de sibilância, atendidas no Pronto Atendimento do Hospital Israelita Albert Einstein. Os vírus respiratórios foram investigados na amostra de lavado nasofaríngeo, exclusivamente por métodos de biologia molecular incluindo RT-PCR em tempo real (vírus sincicial respiratório, influenza, parainfluenza, rinovírus) RT-PCR convencional (coronavírus e metapneumovírus humano) e PCR convencional (adenovírus e bocavírus humano). Os desfechos avaliados foram impacto clínico imediato (hospitalização e admissão em unidade de terapia intensiva - UTI) e tardio (chiado recorrente), através do atendimento inicial e de entrevistas telefônicas aos 15 e 30 dias (impacto imediato) e posteriormente aos 3, 6 e 12 meses (impacto tardio). Chiado recorrente foi caracterizado pela ocorrência de três ou mais episódios de sibilância tratamento com medicação profilática para asma durante o seguimento. A verificação de associação entre as variáveis explicativas e os desfechos escolhidos foi feita através de modelo de regressão logística uni e multivariada, expressando os resultados em razão de chance (*odds ratio*, OR). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Foram incluídos 77 lactentes, com mediana de idade de 6 ± 4 meses. A identificação de pelo menos um vírus respiratório ocorreu em 72 (93%) das amostras. O vírus sincicial respiratório foi positivo em 49 amostras (64%), seguido por rinovírus (34%), enterovírus (21%), metapneumovírus humano (16%), bocavírus humano (12%), parainfluenza 3 (8%) e influenza A (2%), coronavírus (2%) e parainfluenza 1 (1%). Co-deteções foram observadas em 34 amostras (44%). Dos 77 lactentes incluídos no estudo, 32 (41%) necessitaram internação e 8 foram admitidos em UTI, sendo que estes eram mais jovens ($p=0,02$) e apresentaram maior tempo de internação ($6,4 \times 3,9$ dias, $p=0,012$) em relação aos lactentes que internaram em apartamento. Quanto ao desfecho internação, idade mais jovem esteve associada a maior risco de internação (OR=0,83; $p=0,026$), enquanto atopia teve efeito protetor (OR=0,20; $p=0,021$). Identificação de enterovírus esteve associada a aumento do risco para internação (OR=6,03; $p=0,027$). Prematuridade foi a única variável associada a um significativo risco de admissão em UTI (OR=24,51; $p=0,002$). Após um ano de seguimento, 55% dos pacientes foram caracterizados como chiadores recorrentes, mas nenhum fator de risco ou etiologia viral estiveram associados a este desfecho.

Descritores: bronquiolite, vírus, hospitalização, sons respiratórios.

ABSTRACT

Nascimento, M.S. **Acute viral bronchiolitis: etiology and early and late clinical impact in patients attending a private hospital in São Paulo.** 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Acute viral bronchiolitis is the most common disease of the lower respiratory tract in infants and young children throughout the world, being one of the main causes for hospitalization during infancy. A specific group of children has a greater risk for developing more severe cases, where the most important associated risk factors are: age, gender, co-morbidities (prematurity, presence of bronchopulmonary dysplasia and congenital heart diseases, deficiency in the immune system), environmental and social-economic factors, and a family history of allergies. The main etiological agents associated with bronchiolitis are the respiratory syncytial virus (RSV), influenza types A and B, parainfluenza types 1, 2 and 3 and adenovirus, picornavirus, coronavirus and human metapneumovirus. The objective of this study was to evaluate the etiology and clinical impact of respiratory viruses in infants aged 0 to 2 years, during the first episode of wheezing, attended at the Emergency Unit of the Albert Einstein Israeli Hospital. Respiratory viruses were investigated in nasopharyngeal aspirates, using molecular biology methods, including real time RT-PCR (respiratory syncytial virus, influenza, parainfluenza, rhinovirus) conventional RT-PCR (coronavirus and human metapneumovirus) and conventional PCR (adenovirus and human bocavirus). The evaluated outcomes were immediate clinical impact (hospitalization and admission in an intensive care unit – ICU) and late impacts (recurrent wheezing), in the initial approach and telephone interviews at 15 and 30 days (immediate impact) and later at 3, 6 and 12 months (late impact). Recurrent wheezing was characterized by the occurrence of three or more wheezing episodes or treatment with prophylactic medicines for asthma during the follow-up. The verification of the association between the explanatory variables and the chosen outcomes was done using uni and multivariate logistic regression models, expressing the results in odds ratio (OR). The level of significance adopted was $p < 0.05$. Seventy-seven infants were included, with a median age of 6 ± 4 months. The identification of at least one respiratory virus occurred in 72 (93%) of the samples. Respiratory syncytial virus tested positive in 49 samples (64%), followed by rhinovirus (34%), enterovirus (21%), human metapneumovirus (16%), human bocavirus (12%), parainfluenza type 3 (8%) and influenza type A (2%), coronavirus (2%) and parainfluenza type 1 (1%). Co-detections were observed in 34 samples (44%). Of the 77 infants included in this study, 32 (41%) needed hospitalization and 8 were admitted to ICU, the latter ones being younger ($p = 0.02$) and were hospitalized for a longer period of time (6.4×3.9 days, $p = 0.012$) in relation to the infants who were admitted in wards. Regarding the hospitalization outcome, younger patients had a greater risk of hospitalization ($OR = 0.83$; $p = 0.026$), while allergies had a protective effect ($OR = 0.20$; $p = 0.021$). The identification of enterovirus was associated with a greater risk of hospitalization ($OR = 0.83$; $p = 0.027$). Prematurity was the only variable associated with a significant risk of admission in ICU ($OR = 24.51$; $p = 0.002$). After a follow-up one year later, 55% of the patients were characterized as recurrent wheezers, but no risk factor or viral etiology were associated with this outcome.

Descriptors: bronchiolitis, virus, hospitalization, respiratory sounds.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR convencional para identificação do β -actina.....
- Quadro 2** - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR em tempo real para identificação do VSR.
- Quadro 3** - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR em tempo real para identificação do influenza A e B.
- Quadro 4** - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR em tempo real para identificação do parainfluenza 1, 2 e 3.
- Quadro 5** - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR em tempo real para identificação do rinovírus e enterovírus.
- Quadro 6** - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR convencional para identificação de HCoV.
- Quadro 7** - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR convencional para identificação de hPMV.
- Quadro 8** - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR convencional para identificação de adenovírus.
- Quadro 9** - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR convencional para identificação do hBoV.
- Quadro 10** - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR em tempo real para identificação do hBoV.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Fluxo de consultas e coletas dos pacientes durante o estudo
- Figura 2 -** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR corado em brometo de etídio 0,5 mcg/ml. Marcador: 50bp *ladder* – Pharmacia. Amostras de lavado nasofaríngeo colhidas no estudo. Ct+: controle positivo (amostra positiva para HCoV) Ct-: controle negativo (somente mistura de reagentes)
- Figura 3 -** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR corado em brometo de etídio 0,5 mcg/ml. Marcador: 50bp *ladder* – Pharmacia. Amostras de lavado nasofaríngeo colhidas no estudo. Ct+: controle positivo (amostra positiva para hMPV) Ct-: controle negativo (somente mistura de reagentes)
- Figura 4 -** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR corado em brometo de etídio 0,5 mcg/ml. Marcador: 50bp *ladder* – Pharmacia. Amostras de lavado nasofaríngeo colhidas no estudo. Ct+: controle positivo (amostra positiva para adenovírus) Ct-: controle negativo (somente mistura de reagentes)
- Figura 5 -** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR corado em brometo de etídio 0,5 mcg/ml. Marcador: 50bp *ladder* – Pharmacia. Amostras de lavado nasofaríngeo colhidas no estudo. Ct+: controle positivo (amostra positiva para hBoV) Ct-: controle negativo (somente mistura de reagentes)
- Figura 6 -** Desenho do estudo, desde a inclusão até a última entrevista. Na inclusão (caixa roxa) o paciente foi examinado e a amostra de lavado nasofaríngeo foi colhida; em todos os outros momentos (caixas azuis) foram realizadas entrevistas telefônicas.
- Figura 7 -** Fluxograma do estudo

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Características dos pacientes incluídos e não incluídos no estudo
- Tabela 2 -** Antecedentes dos pacientes incluídos no estudo (n=77)
- Tabela 3 -** Sintomas relatados pelos pais dos pacientes nos cinco dias precedendo a consulta (n=77)
- Tabela 4 -** Achados clínicos observados nos pacientes incluídos no estudo
- Tabela 5 -** Achados radiológicos dos pacientes submetidos à radiografia do tórax.
- Tabela 6 -** Vírus respiratórios identificados durante o estudo.
- Tabela 7 -** Medianas de idade dos pacientes de acordo com a identificação dos vírus
- Tabela 8 -** Comparativo dos sintomas que persistiram com 15 dias e com 30 dias após episódio inicial de sibilância.
- Tabela 9 -** Regressão logística binária univariada e multivariada tendo como desfecho primário a ocorrência de internação.
- Tabela 10 -** Regressão logística binária univariada e multivariada tendo como desfecho primário a ocorrência de admissão em Semi-UTI
- Tabela 11 -** Sintomas relatados no seguimento tardio (3, 6 e 12 meses) após o episódio inicial.
- Tabela 12 -** Tratamentos referidos durante o seguimento tardio (3, 6 e 12 meses) após o episódio inicial
- Tabela 13 -** Características dos pacientes que cursaram ou não com chiado recorrente e/ou diagnóstico médico de asma (MD asma).
- Tabela 14 -** Regressão logística binária univariada e multivariada tendo como desfecho primário chiado recorrente.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 -** Distribuição por idade e sexo dos pacientes incluídos no estudo.....
- Gráfico 2 -** Prevalência e tipo de atopia de parentes de 1º grau dos pacientes incluídos no estudo
- Gráfico 3 -** Histograma com os valores de escore de gravidade (RDAI*) (A) e distribuição dos valores de escore de gravidade de acordo com a faixa etária (B).
- Gráfico 4 -** Distribuição por idade dos pacientes de acordo com internação (A) e admissão em terapia intensiva (B).
- Gráfico 5 -** Vírus respiratórios identificados no estudo (mais de um agente por amostra).
- Gráfico 6 -** Distribuição da quantidade de vírus respiratórios identificados por amostra.
- Gráfico 7 -** Distribuição sazonal das coletas e da identificação dos vírus respiratórios.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µm	micrometros
µl	microlitros
BD	broncodilatador
Bp	pares de bases
cDNA	DNA complementar ao RNA
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTPs	desoxinucleotídeos fosfatados
entero	enterovírus
fluA	influenza A
FR	freqüência respiratória
h	hora
hBoV	bocavírus humano
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
hMPV	metapneumovírus humano
IC	intervalo de confiança
IFN-γ	interferon gama
lrpm	incursões respiratórias
LV	leite de vaca
MD asma	diagnóstico médico de asma
mg/ml	miligramas por mililitro
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	mililitros
mM	milimolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	odds ratio
paraflu 1	parainfluenza 1
paraflu 2	parainfluenza 2
paraflu 3	parainfluenza 3
PCR	reação em cadeia da polimerase
Prot. F	proteína F
rino	rinovírus

RNA	ácido ribonucleico
RNase	enzima que degrada o RNA
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa
SatO ₂	saturação de oxigênio
Semi-UTI	Semi Intensiva / Unidade de Terapia ntensiva
UPA	prontoatendimento
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VAS	vias aéreas superiores
VSR	vírus sincicial respiratório

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

2.2 Objetivos Específicos

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

3.2 Pacientes

3.3 Consultas Clínicas e coletas

3.4 Processamento inicial e estoque das amostras clínicas

3.5 Diagnóstico de infecções virais

3.5.1 Extração de DNA e RNA das amostras clínicas

3.5.2 Síntese de cDNA (RT-PCR)

3.5.3 Desenho de *primers* e sondas para PCR em tempo real

3.5.4 Reações de PCR / RT-PCR

3.5.5 Controle de extração de ácidos nucleicos – RT-PCR para β -actina

3.6 Identificação de vírus respiratórios

3.6.1 Identificação do Vírus Sincicial Respiratório (VSR)

3.6.2 Identificação do vírus influenza A e B

3.6.3 Identificação dos vírus parainfluenza 1, 2 e 3

3.6.3 Identificação do rinovírus e enterovírus

3.6.4 Identificação do coronavírus (HCoV)

3.6.5 Identificação do metapneumovírus humano (hMPV)

3.6.6 Identificação do adenovírus

3.6.7 Identificação do bocavírus humano (hBoV)

3.7 Desfechos clínicos

3.8 Controle de coletas e registro de dados

3.9 Aspectos éticos

3.10 Análise estatística

3.11 Aspectos operacionais

4 RESULTADOS

5 DISCUSSÃO

6 CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

ANEXOS

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A bronquiolite viral aguda é definida como uma inflamação de pequenas vias aéreas (bronquíolos) na qual ocorre aumento na secreção de muco, degradação e mortes celulares, infiltrados linfocitário peribronquiolar e edema da mucosa (1). Essa combinação de lesão celular e edema levam a obstrução da via aérea com grau variável de intensidade que costuma ser menos tolerado em crianças menores nas quais as manifestações clínicas são mais evidentes. (2)

A bronquiolite viral aguda é uma das principais causas de hospitalização na infância cuja incidência vem crescendo nas ultimas décadas. Shay e colaboradores em um estudo publicado em 1999 sugerem que o aumento significativo do número de internações por bronquiolite no início da década de 80 tenha sido uma adequação de diagnóstico, já que lactentes que eram diagnosticados inadequadamente como tendo pneumonia passaram a ser diagnosticados com bronquiolite viral aguda (3;4), porém, a partir de 1988 o número de internações por bronquiolite nos EUA aumentou em quase 20.000 casos em 10 anos (5).

Outro ponto relevante foi a introdução de oxímetros de pulso nas unidades de pronto atendimento, pois a avaliação clínica de dispnéia e sibilância pode não apresentar correlação direta com os valores de saturação. Em um estudo publicado em 2003, os autores mostraram que as taxas de internação eram significativamente maiores nas crianças com $\text{SatO}_2=92\%$ (83%) quando comparadas àquelas com $\text{SatO}_2=94\%$ (43%), mas esta diferença de apenas 2% nos valores de saturação pode não ter qualquer implicação clínica (6).

O impacto econômico gerado por este crescimento incontestável do número de admissões por bronquiolite é outro ponto de grande importância epidemiológica,

pois centenas de milhões de dólares são gastos anualmente com estas admissões em diversos países do mundo (7;8).

A taxa de mortalidade da doença é relativamente baixa, variando de 0 a 1% em lactentes previamente hígidos e chegando a 3% em lactentes com comorbidades associadas (8).

Os principais agentes etiológicos historicamente associados à bronquiolite são o vírus sincicial respiratório (VSR); influenza A e B; parainfluenza 1, 2 e 3 e adenovírus.

Desde sua descoberta, há 45 anos atrás, o VSR tem sido considerado o principal patógeno causador de infecções do trato respiratório inferior em crianças jovens (9), responsável por 40-90% das bronquiolites (10;11). Um estudo recente concluiu que VSR é o mais importante causador de hospitalização em crianças menores que dois anos (12) e esta frequência tem triplicado nos últimos 25 anos (13). No Brasil, o VSR é identificado em cerca de 60% das crianças com diagnóstico de bronquiolite (14;15) das quais 70-90% tem menos que um ano de idade (15-17).

A sazonalidade do VSR no Brasil é bem definida, porém de modo diferente em cada área geográfica do país. Na região nordeste, onde o clima é tropical, os picos de incidência do VSR acontecem nos meses de maio e junho, período mais chuvoso da região (16). Na região sudeste do Brasil, onde o clima é sub-tropical, o aparecimento dos surtos de VSR não está associado com o período de chuva, mas sim com baixas temperaturas. Em cidades como Uberlândia, São Paulo e Rio de Janeiro o surgimento do VSR tem início nos meses de março, com pico em maio, estendendo-se até agosto (14;15;17;18). No sul do país o pico de incidência mostra uma associação temperatura-dependente, aparecendo nos meses frios do ano: julho e agosto (19).

O vírus influenza é um agente respiratório altamente contagioso que afeta indivíduos de todas as idades (20), porém, crianças jovens podem ter risco aumentado para apresentar complicações decorrentes de uma infecção pelo influenza (21). Estudos realizados nas cidades de Curitiba e São Paulo, incluindo crianças hospitalizadas com sintomas de infecção do trato respiratório inferior mostram uma baixa incidência de influenza, 4,3% e 5% respectivamente. Nestes estudos o influenza A predominou, quase que em sua totalidade, entre as amostras positivas para este vírus (20;22). Em contrapartida, Costa e colaboradores identificaram influenza em 9,5% dos casos, porém, 2/3 destas crianças apresentavam sintomas somente de vias aéreas superiores. (17). Quanto à sazonalidade de influenza no Brasil, picos de incidência ocorrem nos meses de baixa temperatura. (17;20;22).

Neste ano de 2009 uma pandemia de um novo genótipo de influenza A, o H1N1 foi descrita em todo o mundo. Altas taxas de hospitalização estiveram associadas à suspeita de infecção pelo agente em nosso meio, em parte pelo efeito da mídia e até pela grande desinformação da classe médica sobre etiologia e significado das infecções respiratórias virais. Um estudo conduzido na Califórnia incluindo 1088 pacientes hospitalizados indicou que, em lactentes e crianças jovens, além da alta taxa de hospitalização, a incidência do H1N1 nesta população era maior do que a observada com o influenza A sazonal (23) Muito ainda se discute sobre a pandemia e o real impacto deste agente nas doenças respiratórias da infância ainda é desconhecido.

O vírus parainfluenza é comumente citado entre os vírus causadores de doenças respiratórias em lactentes e jovens crianças (24). O parainfluenza 3 é o que apresenta maior incidência no Brasil e seu modelo de sazonalidade ainda não é bem

definido. Enquanto algumas regiões mostram picos bem definidos no final do inverno, justamente quando diminuiu a incidência do VSR, outros detectam o parainfluenza durante todo ano (17;22).

O adenovírus como causador de bronquiolite viral aguda tem uma incidência em torno de 4% (14;25;26). Apesar da incidência relativamente baixa, o adenovírus é comumente associado a quadros clínicos mais graves com presença de consolidações pulmonares e derrames pleurais (26;27) além de ser o principal agente etiológico da bronquiolite obliterante pós-infecciosa (28;29). Além disso, o número de casos fatais pode chegar a 25%, 10 vezes mais que o VSR (27).

A importância dos picornavírus (rinovírus e enterovírus) vem sendo ressaltada nos últimos anos. Um estudo de coorte, realizado na Finlândia, incluindo 329 crianças, constatou que 91% das crianças até 2 anos, com sintomas de infecção de vias aéreas superiores, apresentavam anticorpos específicos do rinovírus (30). Apesar de sua descoberta em 1960, somente na última década as pesquisas se voltaram para o impacto do rinovírus em infecções de vias aéreas inferiores, em parte pelos avanços das técnicas moleculares para identificação viral. Vários estudos confirmam a importante participação dos picornavírus em quadros respiratórios já nos primeiros anos de vida (31-35).

Papadopoulos e colaboradores, em um estudo que incluía lactentes com diagnóstico de bronquiolite, encontraram uma associação do rinovírus com maior gravidade clínica (OR= 5,4 e $p=0,0004$). Lactentes com amostras positivas para rinovírus tinham maior escore de gravidade e permaneciam mais tempo internados em comparação aos lactentes que tinham amostra positiva para VSR. (31). Outros estudos publicados mais recentemente não confirmaram este achado (36;37). Em um estudo nacional, realizado em Porto Alegre, incluindo 45 lactentes com

bronquiolite, os autores descrevem uma incidência de 17% de rinovírus, sendo o segundo vírus mais identificado (38)

Descoberto em 2001 e originalmente isolado de crianças com doenças respiratórias, o metapneumovírus humano (39) vem sendo reconhecido como patógeno comum em doenças do trato respiratório inferior em lactentes (40;41). Estudos realizados com lactentes hospitalizados mostram que sua incidência varia entre 5-13% (42;43) e devido a sazonalidade semelhante aos outros vírus respiratórios, co-deteccões são freqüentes, principalmente com VSR e influenza (44).

Há relatos na literatura de que co-deteccões do hMPV com VSR podem aumentar a gravidade da doença, mas o assunto ainda é controverso. Semple e colaboradores encontraram, em lactentes sob ventilação mecânica, 70% de co-deteccão de hMPV com VSR concluindo que esta co-deteccão aumenta o risco de gravidade clínica em 10 vezes ($OR=10,9$ e $p=0,001$) (45). van Woensel e colaboradores não encontraram amostras positivas de hMPV em lactentes que necessitaram de ventilação mecânica por gravidade clínica causada pelo VSR. Este estudo concluiu que não havia associação da gravidade da doença com a presença de co-deteccões de hMPV com VSR (46).

No Brasil, um estudo conduzido na cidade de São Paulo com crianças de 0 a 5 anos que apresentavam sintomas respiratórios aponta o hMPV como o segundo vírus mais prevalente, positivo em 18% dos casos (22). Co-deteccões foram mais comuns com VSR (5 casos) e adenovírus (4 casos). Quanto à sazonalidade, foram detectadas amostras positivas durante quase todo ano, com exceção dos 3 primeiros meses do ano (22).

O coronavírus humano, descoberto em 1960 (41) e associado principalmente a quadros de resfriado comum, mais recentemente vem sendo associado à bronquiolite. O coronavírus NL63 tem sido associado com infecções mais graves do trato respiratório inferior, com uma incidência variando entre 1-10%. (47-49). No Brasil não há estudos do perfil epidemiológico deste vírus e tão pouco do impacto clínico.

Em 2005, Allander e colaboradores descreveram um novo parvovírus até então não identificado em humanos, o bocavírus humano (hBoV), assim denominado devido às suas semelhanças com os parvovírus bovino e canino. Um estudo canadense mostra uma incidência de 5%, com uma alta taxa de co-infecções (50). Muito pouco se sabe ainda sobre o hBoV. No Brasil, Gagliardi e colaboradores relataram prevalência de 10% de hBoV em amostras de crianças com infecção respiratória atendidas em unidades de emergência em Ribeirão Preto, São Paulo, mas em 80% das vezes o hBoV estava associado a outros vírus respiratórios (51). Entre as muitas questões a serem respondidas sazonalidade, fatores de risco e impacto clínico são pontos importantes para futuras investigações.

O pico de incidência da bronquiolite ocorre em crianças abaixo dos 12 meses de idade (52), mas um grupo específico de crianças tem risco aumentado para desenvolver quadros mais graves, com internação hospitalar, admissão em terapia intensiva e ventilação mecânica. Segundo uma diretriz publicada pela Academia Americana de Pediatria, os principais fatores de risco para bronquiolite viral aguda grave são a idade, prematuridade, presença de displasia broncopulmonar e cardiopatia congênita (53). Outros autores apontam fatores como imunodeficiência, sexo, sazonalidade (54), fatores ambientais (55) e

socioeconômicos (56;57), exposição ao fumo (57), história de atopia (58), resposta imunológica (59) e agente etiológico (45) como determinantes no impacto clínico.

Crianças menores que seis meses tem maior risco de hospitalização do que as maiores (14;15;17;54;60;61). Rietveld e colaboradores observaram que no perfil de crianças internadas com bronquiólite, idade inferior a seis meses estava presente em 76% dos casos (61) e a taxa de admissão hospitalar decrescia com o aumento da idade mesmo em crianças com outros fatores de risco associado (prematuridade, cardiopatias congênitas) (62).

Com relação à prematuridade, o risco de hospitalização de uma criança nascida com idade gestacional de 32 semanas ou menos aumenta em até cinco vezes quando comparada com população geral (61). Em relação às re-hospitalizações, a idade gestacional tem um impacto significativo: lactentes nascidos com idade gestacional entre 29 e 32 semanas têm quase quatro vezes mais chance de apresentar doença pulmonar grave com prolongamento da estadia no hospital do que crianças nascidas com idade gestacional entre 32 e 36 semanas (63). Quando a prematuridade vem associada à displasia pulmonar mais da metade das crianças até seis meses de idade necessitam de internação por infecção por VSR (54).

Crianças com cardiopatia congênita com infecção por VSR têm maior risco para desenvolver doença grave com ocorrência de insuficiência respiratória quando comparada a crianças sem anormalidade cardíaca (64). A hospitalização, neste grupo de crianças chega a 5% e pode atingir 10% dependendo da gravidade da cardiopatia (65). Crianças que apresentam hipertensão pulmonar têm risco de morte cinco vezes maior do que as crianças que não apresentam este tipo de complicação (54)

Meert e colaboradores estudaram o impacto de co-morbidades associadas (prematuridade, displasia bronco pulmonar e cardiopatia congênita) na gravidade de uma infecção pelo VRS. Os pacientes previamente hígidos necessitaram menos de ventilação mecânica, oxigenioterapia e admissões em unidades de terapia intensiva ($p < 0,01$) (66).

O comprometimento imunológico quer seja causado por quimioterapia ou por tratamento prolongado com corticosteróide ou relacionado à imunodeficiência primária aumentam o risco para infecção por VSR, podendo evoluir com pneumonias graves e resultar em alta taxa de mortalidade (67).

Crianças do sexo masculino têm uma tendência a apresentar formas mais graves da doença (16;17;61;68) e também o agente etiológico ou a presença de co-deteccões podem estar relacionados com a gravidade da bronquiolite. (45).

Com relação aos fatores ambientais, um estudo realizado na cidade de São Paulo buscou relacionar se o aumento nos níveis de poluentes do ar levavam a um aumento no número de pacientes que buscavam as unidades de prontoatendimento (UPA) e um aumento nas admissões hospitalares por bronquiolite e asma. Todos os principais poluentes presentes no ar da cidade de São Paulo estavam relacionados com maior número de visitas as UPA e maior número de crianças internadas com diagnóstico de asma ou bronquiolite (55).

A influência da exposição ao fumo e da história familiar de atopia no impacto clínico da bronquiolite ainda é tema controverso na literatura. Tabagismo materno durante a gestação pode diminuir a função pulmonar por alterar as propriedades elásticas do pulmão, levando a um aumento da responsividade da via aérea (69). A exposição ao fumo pós-natal é considerada um fator de risco importante para

gravidade da bronquiolite (58) e potencializador dos sintomas da doença frente uma infecção pelo VSR (70).

Um estudo realizado com 172 lactentes com bronquiolite por VSR concluiu que história familiar de atopia aumentou a frequência de hospitalização e o tempo de internação (71). Em contrapartida, Bradley e colaboradores observaram um efeito protetor da atopia familiar, demonstrando maior saturação de oxigênio e menor período de internação entre os pacientes com este antecedente (58).

Bont e colaboradores quantificaram níveis de IFN- γ em aspirado nasal de lactentes com bronquiolite viral aguda e observaram que lactentes com manifestações clínicas mais graves apresentavam níveis de IFN- γ mais baixos, demonstrando que a gravidade da doença é diretamente dependente da resposta imune que indivíduo produz (59).

A importância com relação ao diagnóstico etiológico fez com que grandes avanços nas técnicas de detecção viral fossem alcançados. Os estudos iniciais de infecções respiratórias virais em crianças foram baseados em sorologias com amostras pareadas e isolamento viral (72). Nos últimos anos houve grande desenvolvimento de métodos de detecção de antígenos, baseados em imunofluorescência. Vários kits comerciais de detecção de antígenos estão disponíveis no mercado para detecção de VSR, influenza, parainfluenza e adenovírus, sendo o desempenho do método sabidamente inferior para identificação deste último vírus (73).

Mais recentemente, a emergência de métodos moleculares para o diagnóstico de infecções respiratórias virais vem modificando o conhecimento sobre prevalência de infecções virais em pediatria, de tal modo que atualmente estes métodos representam um novo “padrão ouro” em diagnóstico viral. Existem evidências de que

os métodos de biologia molecular apresentam sensibilidade e especificidade ao redor de 100% quando comparados aos métodos de cultura em tecido ou detecção de antígenos virais com anticorpos monoclonais (72).

Quando comparados à cultura em tecidos, os métodos moleculares apresentam sensibilidade superior em até 30% (72;74;75). Além disso, com a identificação mais acurada de vírus respiratórios como os picornavírus, coronavírus e metapneumovírus humano, através de métodos moleculares (76), um crescente número de publicações traz em seus resultados a presença de co-deteções (37;77-80), o que torna mais complexo o cenário etiológico da bronquiolite quer seja isolado ou em associação com outros agentes.

Apesar do vasto conhecimento relacionado à importância das infecções respiratórias virais em crianças, seu impacto na origem da sibilância e da asma também representa motivo de grande controvérsia. Alguns estudos publicados durante a década de 80 já buscavam uma associação entre infecção viral e risco de chiado (81;82). O principal vírus pesquisado nestes estudos era o VSR, não só por ser o principal patógeno causador de doenças respiratórias nos primeiros anos de vida (9), mas também pelos métodos de detecção viral mais utilizados na época (cultura em tecido e imunofluorescência) terem uma boa sensibilidade para sua detecção (83). Mais tarde, estudos de coorte apontaram o VSR como um dos principais responsáveis na causa de sibilância em lactentes, e sugeriram que uma infecção precoce pelo VSR com bronquiolite grave resultava em risco aumentado de sibilância até a adolescência (84-86).

A utilização de métodos diagnósticos mais sensíveis para detecção de agentes virais tem voltado à atenção dos pesquisadores na participação de outros patógenos no desenvolvimento da asma. Dados mais recentes de estudos de coorte

indicam que a ocorrência de infecções respiratórias moderadas ou graves por rinovírus estão associadas a um maior risco de asma aos três e seis anos de idade (87;88). Outro estudo aponta ainda para o efeito somatório entre infecções respiratórias virais (principalmente rinovírus) e sensibilização a aeroalérgenos (89).

A relação entre infecção viral e subsequente desenvolvimento da asma e atopia é complexa e depende de fatores genéticos, do tipo de resposta imune, tipo de infecção viral, tempo de exposição e gravidade da doença (90;91). Dada a alta complexidade que envolve o assunto, mais pesquisas para esclarecimento e confirmação destes achados são necessárias.

No Brasil, a maioria dos estudos sobre etiologia viral em bronquiolite viral aguda empregou técnicas de cultura viral e imunofluorescência (4;14). A maior parte da literatura disponível enfoca o VSR e poucos estudos de seguimento pós bronquiolite viral aguda foram publicados (38;57). Além disso, há uma relativa escassez de publicações com identificação sistemática de vírus como rinovírus, coronavírus, metapneumovírus humano e bocavírus humano.

Justificativa

Pouco se conhece sobre a etiologia das infecções respiratórias virais na população brasileira, especialmente no que se refere aos vírus que dependem de métodos de biologia molecular para correta identificação (metapneumovírus humano, rinovírus, coronavírus e bocavírus humano). O impacto clínico imediato e tardio das infecções respiratórias virais no 1º episódio de chiado de lactentes também é pouco conhecido em nosso meio.

Pergunta

O presente estudo tem como pergunta quais etiologias virais e fatores de risco estão associados à bronquiolite viral em lactentes e qual impacto eles tem em desfechos como internação e sibilância recorrente.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a prevalência e o impacto clínico de infecções por vírus respiratórios em lactentes com idade entre 0 a 2 anos durante o primeiro episódio de sibilância, atendidas no Pronto Atendimento do Hospital Israelita Albert Einstein.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a prevalência dos vírus respiratórios em lactentes com idade entre 0 a 2 anos durante o primeiro episódio de sibilância, através de métodos de biologia molecular.
- Avaliar o impacto clínico destas infecções virais na população estudada, no período de 15 e 30 dias após sua consulta.
- Avaliar o impacto clínico posterior destas infecções através de contatos telefônicos (3, 6 e 12 meses após o quadro agudo) com os familiares.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de uma coorte prospectiva com inclusão de pacientes com idade até dois anos, durante seu primeiro episódio de sibilância que tenha início há no máximo cinco dias. Os pacientes foram acompanhados através de entrevistas telefônicas periódicas até um ano após a inclusão.

3.2 PACIENTES

Foram incluídos todos os pacientes com idade entre zero e dois anos, atendidos na Unidade de Primeiro Atendimento (UPA) do HIAE com seu primeiro episódio de chiado e início há no máximo cinco dias, desde que seus pais (ou responsáveis) concordassem em participar do estudo e o atendimento fosse realizado em dia e hora factíveis para coleta. Os pais ou responsáveis pelos pacientes receberam explicações através de um folheto (ANEXO 1) e foram convidados a participar do estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2) para tal. O diagnóstico da sibilância foi feito por ausculta pelo médico plantonista da pediatria da Unidade. A certificação de que se trata do 1º episódio de sibilância foi baseada em dados fornecidos pelos familiares, que preencheram um questionário detalhado de antecedentes e sintomas (ANEXO 3).

■ Critérios de inclusão:

Idade até dois anos

Primeiro episódio de chiado

Início do quadro há no máximo 5 dias

Atendimento durante horário de coleta das 7:00h às 16:00h (segunda à sexta)

■ Critérios de exclusão:

Idade acima de dois anos

Episódio de chiado anterior

Início do quadro há mais de cinco dias

Comparecimento ao UPA fora do horário de coleta

Não concordância dos pais em participar do estudo ou assinar o termo de consentimento

3.3 CONSULTAS CLÍNICAS E COLETAS

As coletas foram realizadas nos dias normais de atendimento (2ª a 6ª feira, das oito às 17h) na Unidade de Primeiro Atendimento do HIAE de acordo com o esquema apresentado na FIGURA 1. O atendimento clínico habitual dos pacientes incluiu uma triagem realizada por enfermeira com verificação de dados vitais e oximetria de pulso, além de anamnese e exame físico detalhados, realizados pelo médico pediatra plantonista. Durante o período do estudo, dados clínicos mais dirigidos dos pacientes incluídos foram obtidos e registrados em protocolo específico (ANEXO 4). Exames radiológicos indicados pelo pediatra plantonista ou pelo médico da criança foram registrados no protocolo clínico, mas sua realização não foi

indicada em função da inclusão no estudo. Os procedimentos terapêuticos dentro da Unidade de Primeiro Atendimento também foram registrados no protocolo clínico (ANEXO 4).

Após a consulta e inclusão do paciente baseada no exame clínico e nas respostas ao questionário (ANEXO 2), os pacientes foram submetidos à coleta de aspirado de nasofaringe através da instilação e aspiração de solução salina estéril (1 ml em cada narina) em tubo próprio, conservado e transportado em banho de gelo. As coletas foram realizadas pela fisioterapeuta ou enfermeira da Unidade, devidamente treinadas para a realização do procedimento. As amostras foram identificadas com etiquetas numeradas e encaminhadas para os laboratórios de destino, num período máximo de 2 horas. O médico pediatra da criança foi notificado da inclusão do seu paciente na pesquisa quando os pais assim solicitaram (ANEXO 5).

3.4 PROCESSAMENTO INICIAL E ESTOQUE DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

As amostras de lavado nasal, devidamente identificadas, tiveram inicialmente seu volume total ajustado para 3 ml com solução salina estéril. Foram em seguida aliquotadas em 6 tubos separados. Dois tubos com volume de 140 µl foram destinados para congelamento em freezer -80°C para extração de RNA/DNA e identificação viral. Dois tubo de 1 ml também foram armazenados em freezer -80°C como reserva para eventuais repetições. O restante foi centrifugado a 500 g por 5 minutos para separação das células e o sobrenadante foi armazenado em freezer -80°C para posterior análise dos marcadores inflamatórios. O pellet (precipitado) contendo as células foi solubilizado em 1 ml de Trizol e estocado também em freezer -80°C para posterior análise de expressão de RNA mensageiro de citocinas.

Figura 1 - Fluxograma de consultas e coletas dos pacientes durante o estudo.

3.5 DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS

3.5.1 Extração de DNA e RNA das amostras clínicas

As extrações de DNA e RNA viral foram feitas através do emprego de kits comerciais contendo colunas de sílica para purificação de ácidos nucleicos. O kit empregado foi o QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados somente produtos isentos de RNase para assegurar uma boa qualidade das amostras para as reações de PCR.

3.5.2 Síntese de cDNA (RT-PCR)

A etapa de transcrição reversa (RT-PCR) foi realizada através do kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo sugerido pelo fornecedor, utilizando 20 ul de RNA recém-extraído.

3.5.3 Desenho de oligonucleotídeos e sondas para PCR em tempo real

Os oligonucleotídeos desenhados especificamente para este estudo foram escolhidos a partir de estudos de alinhamento de seqüências, selecionadas do GenBank, de regiões conservadas de cepas dos vírus de interesse utilizando o software de análise de seqüências Lasergene v.4.0 (DNASTar Inc., USA), e do software Primer Express v.2.0 (Applied Biosystems) usando os parâmetros de seleção de *primers* e sondas indicados para ensaios do tipo TaqMan, tais como: temperatura de anelamento, tamanho da seqüência de oligonucleotídeos, tamanho do fragmento gerado pelo conjunto. Os conjuntos de oligonucleotídeos para detecção de cada vírus foram testados em diferentes concentrações dos controles positivos e validados antes dos ensaios com as amostras.

3.5.4 Reações de PCR / RT-PCR

A detecção de adenovírus, bocavírus humano, coronavírus, metapneumovírus humano e do gene da β -actina (controle do processo de extração de RNA e síntese de cDNA) foi realizada separadamente, em reações de PCR e RT-PCR individuais. Os métodos escolhidos para a detecção de cada um dos alvos estão detalhados adiante. A detecção de VSR, influenza A e B, parainfluenza 1, 2 e 3, rinovírus e enterovírus (92) foi feita através de RT-PCR em tempo real. Todos os ensaios de detecção viral foram feitos com as amostras em paralelo com controles positivos previamente testados, DNA de plasmídios clonados contendo o fragmento alvo ou ácido nucléico extraído de cepas selvagens do vírus de interesse. Amostras contendo os reagentes, mas sem adição de DNA ou cDNA foram utilizadas como controles negativos em todas as reações.

As reações de PCR e RT-PCR foram realizadas em termocicladores PTC-200 (MJ Research) ou Mastercycler Gradient (Eppendorf); a revelação de produtos foi obtida através de corridas eletroforéticas em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio 0,5 mg/ml. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, PE Europe B.V.).

3.5.5 Controle de extração de ácidos nucléicos – RT-PCR para β -actina

A amplificação do fragmento de β -actina, para verificação da eficiência de extração de RNA, foi realizada em 25 μ l de reação, em que foram utilizados 2,5 μ l de tampão de PCR contendo 2,0 mM de $MgCl_2$ (Biotools, Espanha), 0,8 μ M de mix de dNTPs, 0,5 μ M dos *primers* direto e reverso para hPMV, 1,25 unidades de Taq Polimerase (Biotools) e 2,5 μ l de cDNA da amostra. O perfil de termociclagem

consistiu de uma etapa inicial de 95°C por 15 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; e a última etapa a 72°C por 7 minutos.

Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR convencional para identificação do β -actina.

Oligonucleotídeo	Alvo	Seqüência (5'→3')	Produto	Referência
β -actina (+)	β -actina	GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC	353 bp	(93)
β -actina (-)		CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TCT C		

3.6 IDENTIFICAÇÃO DE VIRUS RESPIRATÓRIOS

3.6.1 Identificação do Vírus Sincicial Respiratório (VSR)

As reações de RT-PCR em tempo real foram preparadas com tampão Amplification Core Mix (Applied Biosystems) e padronizadas para o duplex com *primers* e sondas para a diferenciação entre RSV A e RSV B; foram utilizados 3,0 μ l do TaqMan Core Buffer 10x (contendo ROX), 6,5 μ M de mix de dNTPs, 6,5 μ M de $MgCl_2$ 50 mM, 2,45 unidades de Taq polimerase Gold; 0,42 μ M dos *primers* direto e reverso e 0,2 μ M das sondas fluorescentes; 3,0 μ l de cDNA em um total de 30 μ l por reação. Os experimentos foram realizados em equipamento ABI 7300 (Applied Biosystems), com termociclagem ajustada para 95° por 10 min seguidos de 50 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C (por 1 min).

Quadro 2- Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR em tempo real para identificação do VSR.

Oligonucleotídeo	Alvo	Seqüência (5'→3')	Produto	Referência
RSVA(dir)	Gene N	AGA TCA ACT TCT GTC ATC CAG CAA	98 pb	(94)
RSVA(rev)		TTC TGC ACA TCA TAA TTA GGA G		Este trabalho
RSVA sonda		6FAM-CAC CAT CCA ACG GAG CAC AGG AGA T NFQ		(94)
RSVB(dir)	Gene N	AAG ATG CAA ATC ATA AAT TCA CAG GA	82 pb	(94)
RSVB(rev)		TGA TAT CCA GCA TCT TTA AGT A		Este trabalho
RSVB sonda		VIC- TTC CCT TCC TAA CCT GGA CAT A NFQ		Este trabalho

3.6.2 Identificação do vírus influenza A e B.

As reações de RT-PCR em tempo real foram preparadas utilizando o tampão TaqMan Master Mix 2x (Applied Biosystems). A detecção de Influenza A e B foi realizada em reações separadas de 25 µl, nas quais foram utilizados 12,5 µl do TaqMan Máster Mix 10x; 0,2 µM dos *primers* direto e reverso e 0,1 µM das sondas fluorescentes; 2,5 µl de cDNA. Os experimentos foram realizados em equipamento ABI 7300 (Applied Biosystems), com termociclagem ajustada para 95° por 10 min seguidos de 50 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min.

Quadro 3 - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR em tempo real para identificação do influenza A e B.

Oligonucleotídeo	Alvo	Seqüência (5'→3')	Produto	Referência
fluA (dir)	Gene NS1/NS2	AAA GCG AAT TTC AGT GTG AT	107 pb	(95)
fluA (rev)		GAA AAT GGT GAG ATT T		(95)
fluA sonda		6FAM- CCC TCT TCG GTG AAA GCC CT NFQ		Este trabalho
fluB (dir)	Gene NP	GTC CAT CAA GCT CCA GTT TT	144 pb	(95)
fluB (rev)		TCT TCT TAC AGC AGC TTG CTT GC		(95)
fluB sonda		NED-CCT CCG TCT CCA CCT ACT TCG TT - NFQ		Este trabalho

3.6.3 Identificação dos vírus parainfluenza 1, 2 e 3.

As reações de RT-PCR em tempo real foram preparadas utilizando o tampão TaqMan Master Mix 2x (Applied Biosystems). A detecção de parainfluenza 1, 2 e 3 foi realizada em reações separadas nas quais foram utilizados 12,5 µl do TaqMan Máster Mix 10x; 0,2 µM dos *primers* direto e reverso e 0,1 µM das sondas fluorescentes; 2,5 µl de cDNA. Os experimentos foram realizados em equipamento ABI 7300 (Applied Biosystems), com termociclagem ajustada para 95° por 10 min seguidos de 50 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min.

Quadro 4 - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR em tempo real para identificação do parainfluenza 1, 2 e 3.

Oligonucleotídeo	Alvo	Seqüência (5'→3')	Produto	Referência
paraflu1 (dir)	Gene HN	ACC TAC AAG GCA ACA ACA TC	127 pb	(95)
paraflu1 (rev)		CTT CCT GCT GGT GTG TTA AT		
paraflu1 sonda		NED – CAA ACG ATG GCT GAA AAA GGG A		
paraflu2 (dir)	Gene HN	CCA TTT ACC TAA GTG ATG GAA	115 pb	(95)
paraflu2 (rev)		CGT GGC ATA ATC TTC TTT TT		
paraflu2 sonda		VIC – AAT CGC AAA AGC TGT TCA GTC AC - NFQ		
paraflu3 (dir)	Gene HN	CCA GGG ATA TAY TAY AAA GGC AAA A	100 pb	Este trabalho
paraflu3 (rev)		CCG GGR CAC CCA GTT GTG		
paraflu3 sonda		6FAM-TGG RTG TTC AAG ACC TCC ATA YCC GAG AAA-NFQ		

3.6.4 Identificação do rinovírus e enterovírus.

O diagnóstico das infecções por rinovírus e enterovírus foi realizado através de um método de RT-PCR em tempo real, direcionado à amplificação da região não-codificadora 5'. Foram utilizados *primers* e sondas para detecção específica de membros do gênero enterovirus. As sondas utilizadas para detecção específica de rinovírus foram RHP1 e RHP2. As seqüências dos oligonucleotídeos estão listadas

abaixo. O protocolo empregou o método que utiliza sondas do tipo TaqMan (Applied Biosystems, PE Europe B.V.). A amplificação e detecção de produtos foram realizadas em um aparelho ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, PE Europe B.V.). O método já foi anteriormente testado em uma ampla coleção de sorotipos de rinovírus e também em amostras clínicas, mostrando alta sensibilidade e especificidade em ambas as avaliações (92).

Quadro 5 - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR em tempo real para identificação do rinovírus e enterovírus.

Oligonucleotídeo	Alvo	Sequência (5'→3')	Produto	Referência
rino dir	Região 5'NCR	GCA CTT CTG TTT CCC C	156 pb	(92)
rino rev		GGC AGC CAC GCA GGC T		
RHP1 sonda		6FAM - AGC CTC ATC TGC CAG GTC TA- TAMRA		
RHP2 sonda		6FAM- AGC CTC ATC GAC CAA ACT A- TAMRA		
entero dir	Região 5'NCR	CCC CTG AAT GCG GCT AAT	142 pb	
entero rev		CAA TTG TCA CCA TAA GCA GCC A		
Sonda A		6FAM - GGA CAC CCA AAG TAG TCG GTT CCG CTG C- TAMRA		
Sonda B		6FAM- GAG TTG CCC GTT ACG ACA CAT GCC C – TAMRA		

3.6.5 Identificação do coronavírus (hCoV).

A identificação de coronavírus foi feita através da amplificação de regiões conservadas do gene *pol* 1b. O método é capaz de identificar os coronavírus humanos hCoV-OC43, hCoV-229E, SARS-hCoV e também os recentemente descritos hCoV-NL63 e hCoV-HKU1 (96). Para a reação, foram utilizados 2,5 µl de tampão de reação 10x (Qiagen), 5,0 µl de Q solution 5x (Qiagen), 1 µM de mix de dNTPs, 0,5 µM de *primers* direto e reverso, 2,5 unidades de Taq Polimerase Qiagen e 2,5 µl de cDNA das amostras em 25 µl totais de reação. Os parâmetros de

termociclagem utilizados para este ensaio, em equipamento Eppendorf Mastercycler foram 95° por 3 min seguidos de 40 ciclos de 94°C por 1 min, e 56°C por 1 min e 72° por 1 min, com etapa de extensão final por 10 min a 72° C.

Quadro 6 - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR convencional para identificação de hCoV.

Oligonucleotídeo	Alvo	Seqüência (5'→3')	Produto	Referência
CORO1	<i>Pol 1b</i>	TGA TGG GTT GGG ACT ATC CTA AAT GTG A	220 pb	(97)
CORO2		GTA GTT GCA TCA CCG GAA GTT GTG CCA CC

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR corado em brometo de etídio 0,5 mcg/ml. Marcador: 50bp *ladder* – Pharmacia. Amostras de lavado nasofaríngeo colhidas no estudo. Ct+: controle positivo (amostra positiva para hCoV) Ct-: controle negativo (somente mistura de reagentes)

3.6.6 Identificação do metapneumovírus humano (hMPV).

Na reação de amplificação do fragmento da proteína F de hMPV de 25 µl foram utilizados 2,5 µl de tampão de PCR contendo 2,0 mM de MgCl₂ (Biotools, Espanha), 0,8 µM de mix de dNTPs, 0,5 µM dos *primers* direto e reverso para hPMV,

2,5 unidades de Taq Polimerase (Biotools) e 2,5 µl de cDNA da amostra. O perfil de termociclagem, em termociclador PTC 200 (MJ Research) consistiu de uma etapa inicial de 95°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; e a última etapa a 72°C por 7 minutos.

Quadro 7 - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR convencional para identificação de hPMV.

Oligonucleotídeo	Alvo	Seqüência (5'→3')	Produto	Referência
hMPV(+)	Prot. F	GAG CAA ATT GAA AAT CCC AGA CA	347 pb	(98)
hMPV(-)		GAA AAC TGC CGC ACA ACA TTT AG

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR corado em brometo de etídio 0,5 mcg/ml. Marcador: 50bp ladder – Pharmacia. Amostras de lavado nasofaríngeo colhidas no estudo. Ct+: controle positivo (amostra positiva para hMPV) Ct-: controle negativo (somente mistura de reagentes)

3.6.7 Identificação do adenovírus.

A identificação de adenovírus foi feita a partir da amplificação da região do gene hexon denominada região hipervariável 7 (HRV-7), comum a todos os sorotipos de adenovírus humanos conhecidos e passível de posterior

seqüenciamento para determinação do sorotipo (Sarantis, 2004 963 /id). Para a reação, foram utilizados 2,5 µl de tampão de reação 10x contendo 15 mM de MgCl₂ (Qiagen), 0,2 µM de MgCl₂ (Qiagen), 0,8µM de mix de dNTPs, 0,5 µM de *primers* direto e reverso, 1,5 unidade de Taq Polimerase Qiagen e 2,5 µl de cDNA das amostras em 25 µl totais de reação. Os parâmetros de termociclagem utilizados para este ensaio, em equipamento Eppendorf Mastercycler, foram 95° por 3 min seguidos de 40 ciclos de 94°C por 1 min, e 56°C por 1 min e 72°C por 1 min, com etapa de extensão final por 10 min a 72°C. Os *primers* utilizados são listados a seguir.

Quadro 8 - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR convencional para identificação de adenovírus.

Oligonucleotídeo	Alvo	Seqüência (5'→3')	Produto	Referência
AD1	<i>Gene hexon</i>	CTG ATG TAC TAC AAC AGC ACT GGC AAC ATG GG	605 pb	(99)
AD2		GCG TTG CGG TGG TGG TTA AAT GGG TTT ACG TTG TCC AT

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR corado em brometo de etídio 0,5 mcg/ml. Marcador: 50bp *ladder* – Pharmacia. Amostras de lavado nasofaríngeo colhidas no estudo. Ct+: controle positivo (amostra positiva para adenovírus) Ct-: controle negativo (somente mistura de reagentes)

3.6.8 Identificação do bocavírus humano (hBoV).

PCR qualitativo

As reações de PCR foram realizadas com *primers* direcionados para a região conservada NP-1 do genoma viral. Em 25 µl de reação foram utilizados 2,5 µl de tampão de PCR (Invitrogen, USA), 1,6 µm de mix de dNTPs, 2,5 uM de MgCl₂; 1,0 µm dos *primers* direto e reverso, 1,25 unidades de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen) e 2,5 µl de cDNA da amostra. O perfil de termociclagem consistiu de uma etapa inicial de 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min e 72°C por 2 min; e a última etapa a 72°C por 7 minutos. Relação dos *primers* utilizados na reação de PCR para identificação de hBoV :

Quadro 9 - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR convencional para identificação do hBoV.

Oligonucleotídeo	Alvo	Seqüência (5'→3')	Produto	Referência
188F	Gene <i>NP-1</i>	GAG CTC TGT AAG TAC TAT TAC	354 pb	(98)
542R		CTC TGT GTT GAC TGA ATA CAG

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR corado em brometo de etídio 0,5 mcg/ml. Marcador: 50bp *ladder* – Pharmacia. Amostras de lavado nasofaríngeo colhidas no estudo. Ct+: controle positivo (amostra positiva para hBoV) Ct-: controle negativo (somente mistura de reagentes)

PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram preparadas utilizando o tampão TaqMan Máster Mix 2x (Applied Biosystems). A detecção foi realizada em reações de 25 µl, nas quais foram utilizados 12,5 µl do TaqMan Máster Mix 10x; 0,2 µM dos *primers* direto e reverso e 0,1 µM das sondas fluorescentes; 2,5 µl de cDNA. Os experimentos foram realizados em equipamento ABI 7300 (Applied Biosystems), com termociclagem ajustada para 95° por 10 min seguidos de 50 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min.

Quadro 10 - Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR em tempo real para identificação do hBoV.

Oligonucleotídeo	Alvo	Seqüência (5'→3')	Produto	Referência
NP-1 (dir)	Gene NP-1	AGA GGC TGC GGC TCA TAT CA	79 pb	(100)
NP-1 (rev)		CAC TTG GTC TGA GGT CTT CGA A		
NP-1 sonda		6FAM- AGG AAC ACC CAA TCA RCC ACC TAT CGT CT-NFQ		

3.7 DESFECHOS CLÍNICOS

Entrevistas telefônicas foram realizadas em 15 e 30 dias, e depois aos três, seis e 12 meses após o episódio inicial de sibilância. Os protocolos de entrevista são diferentes para as entrevistas iniciais (ANEXO 6) e posteriores (ANEXO 7). O enfoque inicial foi direcionado à terapêutica da crise inicial de sibilância e seu impacto imediato, como hospitalização, necessidade de UTI ou ventilação mecânica. Posteriormente os questionários referem-se mais à persistência da sibilância e de sintomas de atopia e hiperreatividade brônquica como tosse produtiva, tosse com exercício e tosse noturna, sintomas de rinite alérgica e dermatites.

Figura 6 - Desenho do estudo, desde a inclusão até a última entrevista. Na inclusão (caixa roxa) o paciente foi examinado e a amostra de lavado nasofaríngeo foi colhida; em todos os outros momentos (caixas azuis) foram realizadas entrevistas telefônicas.

3.8 CONTROLE DE COLETAS E REGISTRO DE DADOS

Todas as amostras coletadas foram identificadas no momento da coleta com etiquetas numeradas e um mapa de controle do fluxo de coletas foi preenchido diariamente no sentido de impedir o extravio de amostras. Os dados referentes ao resultado das culturas, pesquisas virais e situação clínica dos pacientes por ocasião das coletas foram tabulados com o auxílio de um banco de dados (Microsoft Access®) desenvolvido pelo pesquisador principal (LVFSF).

3.9 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido à Comissão de Ética do Hospital Israelita Albert Einstein. A participação foi voluntária, e todos os responsáveis assinaram termo de consentimento (ANEXO 1) para inclusão no projeto de pesquisa.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A análise estatística descritiva incluiu o cálculo da distribuição de frequências para as variáveis categóricas e o cálculo de média, desvio padrão, mediana e limites mínimo e máximo para as variáveis contínuas. A associação entre presença de infecção viral e as demais variáveis categóricas foi avaliada por modelo de regressão logística simples (univariada) e múltipla (multivariada). Apenas as variáveis com $p < 0,25$ foram incluídas na análise mutivariada. As diferenças entre as médias das variáveis contínuas foram calculadas por meio de teste T para os dados com distribuição normal ou testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis em caso contrário. O programa utilizado foi SPSS versão 15.0.

3.11 ASPECTOS OPERACIONAIS:

As coletas foram realizadas durante atendimentos médicos rotineiros de crianças na Unidade de Primeiro Atendimento do HIAE, por membros da equipe da Pesquisa. O diagnóstico de infecções virais através de métodos de biologia molecular (extrações de DNA e RNA, reações de PCR, RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real) foi realizado no Laboratório de Pesquisa Experimental do Instituto de Ensino e Pesquisa do HIAE, que disponibilizou os equipamentos necessários a sua realização.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Durante o período de 01 de março de 2006 a 30 de julho de 2007, 178 lactentes com os critérios de inclusão propostos foram atendidos no Pronto Atendimento do Hospital Israelita Albert Einstein. Deste total, foram incluídos 77 lactentes (43,25%), sendo 50 do sexo masculino (64,93%), com idade entre 15 dias e 21 meses (mediana= 6 ± 4 meses). (Gráfico 1)

Gráfico 1 - Distribuição por idade e sexo dos pacientes incluídos no estudo

Os motivos da não inclusão de 101 pacientes com critérios de inclusão compatíveis foram o atendimento em dias sem possibilidade de coleta de amostra (feriados e finais de semana) e a falta de consentimento dos pais em participar do estudo. As características dos pacientes incluídos e não incluídos no estudo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características dos pacientes incluídos e não incluídos no estudo.

	Incluídos (n=77)	Não Incluídos (n=101)	<i>p</i>
Sexo masculino	50 (64,93%)	59 (58,41%)	0,37*
Idade (meses, mediana±DP)	6±4,6	6,3±4,4	0,48 [#]
Internação	32 (41,55%)	16 (15,84%)	0,0001*

*Teste de qui-quadrado

[#]Teste de Mann-Whitney

No seguimento posterior houve perda de dois pacientes entre admissão e as primeiras entrevistas telefônicas (15 e 30 dias), quatro pacientes não foram localizados para a entrevista de três e seis meses e mais dois pacientes não puderam ser localizados para a entrevista de 12 meses, totalizando uma perda de oito pacientes (10,38%) no seguimento completo da coorte. (Figura 10)

Figura 7 – Número de pacientes elegíveis e incluídos no estudo e total de pacientes que foram acompanhados nas diferentes fases do estudo.

O questionário inicial aplicado aos pais visava o levantamento de antecedentes pessoais e familiares, bem como fatores ambientais para identificação de possíveis fatores de risco de sibilância recorrente e asma. Quanto aos antecedentes pessoais 12 pacientes (15,50%) eram prematuros, sendo oito pacientes (10,38%) nascidos com idade gestacional entre 35 e 37 semanas e quatro pacientes (5,19%) com idade gestacional inferior a 35 semanas.

Além da prematuridade, 11 pais (14,29%) relataram refluxo gastroesofágico e três (3,90%) relataram que seus filhos tinham problemas cardíacos. Em relação aos fatores ambientais, 13 (16,88%) freqüentavam escola e/ou berçário, 14 (18,18%) tinham animal de estimação em casa (gato e/ou cachorro), 15 (19,402%) viviam em casa com fumantes (pai e/ou mãe) e 53 (68,83%) tinham irmãos. A tabela 2 mostra os antecedentes dos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 2 - Antecedentes dos pacientes incluídos no estudo (n=77)

Característica	n	(%)
Atopia pai/mãe/irmão		
nenhum familiar	20	(25,97%)
1 familiar	36	(46,75%)
> 1 familiar	20	(25,97%)
Filho único	24	(31,16%)
Prematuridade	12	(15,50%)
Cardiopatia	3	(3,90%)
Fumante em casa (pai/mãe)	15	(19,40%)
Freqüente berçário/creche	13	(16,88%)
Alergia na pele não relacionada a picadas de inseto	9	(11,68%)
Refluxo gastroesofágico	11	(14,29%)
Cachorro ou gato em casa	14	(18,18%)

Em relação aos antecedentes familiares, 72,72% (56) dos pacientes tinham pelo menos um familiar próximo (pai, mãe e/ ou irmão) com história de alergia e 25,97% (20) tinham dois ou mais familiares com história de alergia. Os tipos de alergia relatados para os familiares estão apresentados no gráfico 2.

Gráfico 2 - Prevalência e tipo de atopia de parentes de 1º grau dos pacientes incluídos no estudo

Os pacientes foram atendidos em um pronto-atendimento pediátrico, e entre as queixas apresentadas uma grande proporção de pacientes apresentava sintomas de vias aéreas superiores (coriza e obstrução nasal), seguindo-se os sintomas de chiado e tosse. Cerca de metade dos pacientes relatava cansaço como uma das manifestações, traduzindo uma intensidade maior do quadro respiratório. A tabela 3 mostra os principais sintomas relatados pelos parentes à admissão.

Tabela 3 - Sintomas relatados pelos pais dos pacientes nos cinco dias precedendo a consulta (n=77)

Sintomas	n (%)
Coriza	57 (74,02%)
Obstrução Nasal	55 (71,42%)
Chiado	52 (67,53%)
Tosse Produtiva	46 (59,74%)
Tosse seca	43 (55,84%)
Cansaço	38 (49,35%)
Febre	37 (48,05%)
Vômito pós-tosse	27 (35,06%)
Diarréia	7 (9,09%)
Cianose	1 (1,29%)

Ao exame físico inicial, boa parte dos pacientes mostrava sinais de acometimento moderado e/ou grave do trato respiratório inferior, já que a frequência

respiratória (FR) encontrava-se aumentada em boa parte dos pacientes (18 a 92 irpm, mediana 44 irpm). Dezoito (27,27%) dos pacientes abaixo de um ano de idade apresentaram FR superior a 50 irpm e três pacientes (27,27%) daqueles com idade superior a um ano apresentaram FR superior a 40 irpm, preenchendo critérios de taquipnéia significativa segundo a OMS (WHO, 1990 193 /id).

Retrações intercostais foram observadas em 41 (53,24%) e gemência observada em 12 (15,58%) dos pacientes. Cianose foi observada em apenas um caso. Outros achados à inspeção e à ausculta do tórax estão apresentados na Tabela 4.

O escore de gravidade foi calculado para 71 pacientes (92,20%), e a mediana encontrada foi seis (Gráfico 3A). Vinte e três pacientes (32,39%) apresentaram escore igual ou superior a oito na avaliação inicial, e o escore máximo identificado foi 13 (um paciente). Não houve diferença significativa de escore nas diferentes faixas etárias (Gráfico 3B).

Gráfico 3 – Histograma com os valores de escore de gravidade (RDAI*) (A) e distribuição dos valores de escore de gravidade de acordo com a faixa etária (B).

A saturação arterial de oxigênio medida por oximetria de pulso à admissão foi registrada em 74 pacientes, variando de 88 a 100%, com uma mediana de 96%. Em 21 pacientes (28,37%) a saturação arterial de oxigênio medida foi inferior a 95%.

Os achados de ausculta pulmonar também estão relatados na Tabela 4, observando-se sibilância em quase todos os pacientes, roncos em mais da metade e presença de estertores crepitantes em cerca de 40% dos casos.

O tratamento ministrado no pronto-atendimento incluiu nebulizações em 69 casos (97,18%) e não há informação sobre o tratamento administrado em seis casos. Broncodilatadores (fenoterol ou salbutamol) foram administrados em 59 casos (83,09%), e ipratrópio utilizado em 14 ocasiões (19,71%), sempre em associação a um broncodilatador. Com relação ao número de nebulizações com broncodilatador, verificaram-se que dez pacientes (14,08%) realizaram duas nebulizações, sete pacientes (9,85%) realizaram três nebulizações e três pacientes (4,22%) realizaram mais do que três inalações durante sua permanência no pronto atendimento.

Corticosteróide foi administrado em 33 ocasiões (46,47%), sendo uma delas por via intramuscular e duas por via intravenosa. O corticosteróide utilizado foi a prednisolona oral em todos os casos, exceto em três ocasiões de uso parenteral (metilprednisolona) e duas situações em que os pacientes já haviam recebido betametasona por via oral em casa.

Tabela 4 - Achados clínicos observados nos pacientes incluídos no estudo.

Achado clínico	n (%)
Gemência	12 (15,58%)
Estridor	2 (2,59%)
Cianose	1 (1,29%)
Febre $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$	8 (10,38%)
Conjuntivite	8 (10,38%)
Otoscopia alterada	7 (9,09%)
Tiragem fúrcula	12 (15,58%)
Tiragem sub-diafragmática	33 (42,85%)
Tiragem intercostal	41 (53,24%)
Batimento asa nariz	3 (3,89%)
Escore gravidade	n=71
≤4	17 (23,94%)
5-8	41 (57,74%)
>8	13 (18,30%)
Ausculta pulmonar	
Sibilos	70 (90,90%)
Roncos	49 (63,63%)
Estertores crepitantes	33 (42,85%)

Radiografias do tórax foram solicitadas em 63 casos (81,81%), sendo relatadas como normais em apenas dez casos. Os achados radiológicos estão descritos na Tabela 5 com predomínio evidente do achado de hiperinsuflação (66,66%).

Tabela 5- Achados radiológicos dos pacientes submetidos à radiografia do tórax.

Achado radiológico	n=63 (%)
Hiperinsuflação	42 (66,66%)
Espessamento brônquico	29 (46,06%)
Atelectasia	3 (4,76%)
Condensação	1 (1,58%)

Dos 77 lactentes incluídos no estudo, 32 (41,55%) necessitaram internação, sendo que 24 (31,16%) em apartamento e oito (10,38%) foram admitidos na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica, destes dois necessitaram de ventilação mecânica, ambos com antecedentes de prematuridade. Não houve diferença

significante de idade entre os pacientes internados e não internados ($p= 0,08$, teste de Mann Whitney), entretanto a idade dos pacientes admitidos em terapia intensiva foi significativamente menor ($p= 0,02$, teste de Mann Whitney) (Gráfico 4)

Gráfico 4 - Distribuição por idade dos pacientes de acordo com internação (A) e admissão em terapia intensiva (B).

O tempo de internação variou de um a 12 dias, com uma média de 3,9 dias. Nos pacientes que necessitaram de UTI o tempo médio aumentou para 6,4 dias ($p= 0,012$, teste de Kruskal Wallis).

A identificação de pelo menos um vírus respiratório ocorreu em 72 (93,50%) das amostras. O vírus sincicial respiratório (VSR) foi positivo em 49 amostras (68,05%), seguido por rinovírus 26 (36,11%), enterovírus 16 (22,22%), metapneumovírus humano 12 (16,66%), bocavírus humano nove (12,50%), parainfluenza 3 seis (8,33%) e influenza A dois (2,77%), coronavírus dois (2,77%) e parainfluenza 1 com um (1,38%) amostra positiva. adenovirus, influenza B e parainfluenza 2 não foram identificados nas amostras incluídas no estudo (Tabela 6, Gráfico 5).

Gráfico 5 - Vírus respiratórios identificados no estudo (mais de um agente por amostra).

Co-deteccões foram freqüentes e 34 (47,22%) lactentes tinham resultado positivo para mais de um vírus (22 casos com dois vírus, oito casos com três vírus e quatro casos com quatro vírus identificados). (Tabela 6, Gráfico 6)

Gráfico 6 - Distribuição da quantidade de vírus respiratórios identificados por amostra.

Tabela 6 - Vírus respiratórios identificados durante o estudo.

Vírus	Infecções únicas	Co-deteccões	total	%
vírus sincicial respiratório	26	23	49	63,63%
rinovírus	5	21	26	33,76%
enterovírus	1	15	16	20,77%
metapneumovírus humano	4	8	12	15,58%
bocavírus humano	1	8	9	11,68%
parainfluenza 3	0	6	6	7,79%
influenza A	1	1	2	2,59%
coronavírus humano	0	2	2	2,59%
parainfluenza 1	0	1	1	1,29%
adenovírus	0	0	0	0,0%
amostras negativas	-	-	5	6,49%

O VSR, metapneumovírus humano, coronavírus e bocavírus humano foram mais frequentes em crianças mais jovens, com média de idade de cinco meses. O parainfluenza 3 foi o que apresentou maior média de idade, 10,14 meses (Tabela 7).

Tabela 7 - Medianas de idade dos pacientes de acordo com a identificação dos vírus respiratórios

Vírus	n (%)	Mediana de idade (meses)
VSR	49 (63,63%)	5,5
rinovírus	26 (33,76%)	6,7
enterovírus	17 (22,07%)	10,5
hMPV	12 (15,58%)	5,3
hBoV	9 (11,68%)	5,1

Gráfico 7 - Distribuição sazonal das coletas e da identificação dos vírus respiratórios.

Quanto à sazonalidade, o número reduzido de pacientes incluídos limita conclusões bem fundamentadas, mas houve predomínio do VSR, rinovírus e enterovírus nos meses de outono-inverno, enquanto o metapneumovírus humano foi mais identificado no final do inverno e início da primavera (Gráfico 7).

Dentre os lactentes que internaram todos apresentaram positividade para pelo menos um vírus. O vírus mais identificado foi o VSR, positivo em 24 casos (75,00%), seguido pelo rinovírus nove (28,12%), enterovírus oito (25,00%), metapneumovírus humano cinco (15,62%), bocavírus humano quatro (12,50%), parainfluenza 3 dois (6,25%) e influenza A um (3,12%).

O rinovírus foi o mais freqüente entre os lactentes que não necessitaram de internação, positivo em 21 casos (46,66%). O VSR ficou em segundo lugar com 18 (40,00%) amostras positivas, seguido por enterovírus e bocavírus humano nove (20,00%) cada um, metapneumovírus humano sete (15,55%), parainfluenza 3 cinco (11,11%), influenza A dois (4,44%) e parainfluenza 1 um (2,22%).

Para o conhecimento do desfecho clínico de cada caso foram realizadas entrevistas telefônicas 15 e 30 dias, três, seis e 12 meses após o quadro inicial (Figura 2). Foram realizadas 75 entrevistas 15 dias após a inclusão no estudo, 75 entrevistas 30 dias após a inclusão no estudo, 74 entrevistas aos três meses, 71 entrevistas aos seis meses e 68 entrevistas após um ano da inclusão no estudo. Em dois casos os pais se recusaram a responder e em nos demais houve mudança de telefone e perda do contato.

O enfoque das duas primeiras entrevistas foi à terapêutica empregada na crise inicial de sibilância e seu impacto imediato, como necessidade de internação e persistência dos sintomas clínicos. Sintomas relacionados às vias aéreas superiores (VAS), como coriza e obstrução nasal, persistiram durante os 30 dias após o quadro

inicial em aproximadamente 40% dos casos. Apenas 4,00% dos pacientes relataram o sintoma de chiado após 30 dias, mas a proporção de pacientes com tosse produtiva foi de 18,66% (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparativo dos sintomas que persistiram com 15 dias e com 30 dias após episódio inicial de sibilância.

Sintomas	Entrevista 15 dias (n=75) n (%)	Entrevista 30 dias (n=75) n (%)
Coriza	20 (26,86%)	29 (38,66%)
Obstrução Nasal	28 (37,33%)	31 (41,33%)
Tosse seca	13 (17,33%)	8 (10,66%)
Tosse Produtiva	14 (18,66%)	14 (18,66%)
Cansaço	7 (9,33%)	6 (8,00%)
Cianose	0 (0%)	0 (0%)
Vômito pós-tosse	6 (8,00%)	1 (1,33%)
Febre	2 (2,66%)	9 (12,00%)
Chiado	0 (0%)	3 (4,00%)

As variáveis investigadas para determinação de associação com os desfechos de internação e admissão em unidade de cuidados semi-intensivos ou intensivos (Semi-UTI) foram idade, sexo, antecedente de prematuridade (idade gestacional <37 semanas), ser filho único, freqüentar creche, antecedente familiar de asma ou alergia, ter fumante em casa, e ter um resultado positivo para os seguintes vírus: VSR, hMPV, rinovírus, enterovírus, bocavírus, parainfluenza 3. A escolha destas variáveis foi baseada na importância clínica e no número de indivíduos com a característica. Idade associou-se com risco de internação de modo inverso; quanto maior a idade, menor o risco. Relato de atopia em familiar teve efeito protetor sobre o desfecho internação (OR= 0,202). Dentre os vírus avaliados, o VSR teve forte

significado na análise univariada (OR= 4,14), porém na análise multivariada apenas o enterovírus apareceu com associação significativa (OR= 6,03). (Tabela 9)

Tabela 9 - Regressão logística binária univariada e multivariada tendo como desfecho primário a ocorrência de internação.

Variável	Análise Univariada				Análise Multivariada			
	OR	IC 95%		p	OR	IC 95%		p
Idade	0,935	[0,840	1,039]	0,212	0,838	[0,718	0,979]	0,026
Sexo masculino	0,522	[0,202	1,351]	0,180	0,493	[0,149	1,624]	0,245
Prematuridade	2,240	[0,641	7,832]	0,207	5,507	[0,896	33,853]	0,066
Filho único	1,249	[0,471	3,313]	0,655				
Familiar c/ asma	1,453	[0,580	3,644]	0,425				
Familiar c/ atopia	0,436	[0,151	1,259]	0,125	0,202	[0,052	0,785]	0,021
Fumante em casa	1,762	[0,565	5,493]	0,329				
Cachorro	0,615	[0,203	1,864]	0,391				
Gato	1,367	[0,182	10,259]	0,761				
Creche/escola	1,220	[0,367	4,051]	0,746				
VSR	4,145	[1,432	11,998]	0,009	2,116	[0,614	7,288]	0,235
rinovírus	0,645	[0,242	1,714]	0,379				
hMPV	1,005	[0,288	3,506]	0,993				
enterovirus	2,124	[0,696	6,479]	0,185	6,033	[1,224	29,726]	0,027
hBoV	0,149	[0,018	1,259]	0,080	0,080	[0,006	1,087]	0,058
parainfluenza 3	0,683	[0,117	3,978]	0,672				

OR: odds ratio IC: intervalo de confiança

VSR: vírus sincicial respiratório hMPV: metapneumovírus humano hBoV: bocavírus humano

Quando o desfecho avaliado foi admissão em Semi-UTI, apenas a prematuridade esteve associada a incremento no risco, tanto na análise univariada (OR= 14,76) quanto na análise multivariada (OR= 24,51). (Tabela 10)

Tabela 10 - Regressão logística binária univariada e multivariada tendo como desfecho primário a ocorrência de admissão em Semi-UTI

Variável	Análise Univariada				Análise Multivariada			
	OR	IC 95%		p	OR	IC 95%		p
Idade	0,876	[0,701	1,094]	0,242	0,833	[0,678	1,024	.082
Sexo masculino	0,889	[0,195	4,043]	0,879				
Prematuridade	14,762	[2,89	75,403]	0,001	24,512	[3,214	186,925]	0,002
Filho único	2,400	[0,546	10,552]	0,247	4,583	[0,613	34,244]	0,138
Familiar c/ asma	1,429	[0,329	6,199]	0,634				
Familiar c/ atopia	1,020	[0,188	5,540]	0,982				
Fumante em casa	0,551	[0,063	4,856]	0,591				
Cachorro	0,429	[0,049	3,739]	0,443				
Gato	3,048	[0,278	33,390]	0,362				
Creche/escola	1,727	[0,308	9,700]	0,535				
VSR	4,500	[0,524	38,645]	0,170	3,927	[0,363	42,466]	0,260
rinovírus	0,251	[0,029	2,163]	0,209	0,307	[0,023	4,125]	0,373
hMPV	1,967	[0,347	11,149]	0,445				
enterovirus	0,514	[0,059	4,513]	0,548				
parainfluenza 3	1,829	[0,186	17,956]	0,605				

OR: odds ratio IC: intervalo de confiança

VSR: vírus sincicial respiratório hMPV: metapneumovírus humano

As entrevistas realizadas aos três, seis e 12 meses após a inclusão foram direcionadas para obtenção de informações sobre persistência do chiado e uso de medicamentos preventivos para asma. Persistência de sintomas de chiado foram relatadas por 26 (36,61%) pacientes aos três meses, 21 (29,57%) aos seis meses e 17 (25,00%) aos 12 meses após o episódio inicial (Tabela 11). Os desencadeantes referidos pelos pais foram infecções respiratórias e mudanças climáticas na maioria dos casos, em todos os momentos avaliados. Sintomas nasais sugestivos de rinite alérgica também foram relatados por boa parte (20 a 50%) dos entrevistados. Necessidade de retorno ao pronto atendimento por problemas respiratórios também

foi relatada para uma grande proporção dos pacientes (cerca de 25%) em todos os momentos avaliados. (Tabela 11)

Tabela 11 - Sintomas relatados no seguimento tardio (três, seis e 12 meses) após o episódio inicial.

Sinais e sintomas	Entrevista 3 meses (n=71)	Entrevista 6 meses (n=71)	Entrevista 12 meses (n=69)
Persistência de chiado	26 (36,61%)	21 (29,57%)	17 (25,00%)
1x/ mês	19 (26,76%)	17 (23,74%)	15 (22,05%)
1x/ 15 dias	3 (4,22%)	2 (2,81%)	2 (2,94%)
1x/ semana	2 (2,81%)	0 (0%)	0 (0%)
> 1x/semana	2 (2,81%)	2 (2,81%)	0 (0%)
contínuo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Desencadeantes			
Infecções	15 (21,12%)	16 (22,53%)	10 (14,70%)
Mudança de tempo	13 (18,30%)	6 (8,45%)	10 (14,70%)
Cheiros fortes	0 (0%)	1 (1,40%)	2 (2,94%)
Fumaça de cigarro	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Retorno a UPA	16 (22,53%)	19 (26,76%)	17 (25,00%)
1 vez	14 (19,71%)	16 (22,53%)	10 (14,70%)
2 vezes	1 (1,40%)	1 (1,40%)	1 (1,47%)
3 vezes	0 (0%)	1 (1,40%)	1 (1,47%)
> 3 vezes	1 (1,40%)	0 (0%)	5 (7,35%)
Sintomas nasais			
Coriza	31 (43,66%)	35 (49,29%)	38 (55,88%)
Espirros	19 (26,76%)	21 (29,57%)	17 (25,00%)
Prurido	14 (19,71%)	17 (23,94%)	18 (26,47%)
Obstrução	30 (42,25%)	15(21,12%)	23 (33,82%)

Após a entrevista dos 12 meses, foi possível caracterizar os pacientes como chiadores recorrentes em 35 casos (45,45%), pois apresentaram três ou mais episódios de sibilância após a inclusão no estudo. Consideramos também como chiadores recorrentes aqueles que foram tratados com medicação profilática para asma. Apesar de termos caracterizado chiado recorrente pelos questionários em 35 pacientes (45,45%), uma proporção menor de pacientes relatou uso de

medicamentos de alívio como broncodilatadores. Note-se ainda a baixa proporção de pacientes com uso de nebulímetros para tratamento, quer seja de alívio ou profilático para sibilância (Tabela 12). O uso de alguma medicação profilática para asma foi relatado por 26 pacientes (33,76%), mas destes apenas 18 relataram sibilância recorrente no questionário. Montelukast foi a principal droga profilática relatada pelos pacientes (24,67%), seguindo-se fluticasona (9,09%), cetotifeno (5,19%) e combinação fluticasona+salmeterol (2,59%). Tratamento alternativo foi relatado por 13 pacientes (16,88%), e alergia alimentar (caracterizada pela troca da fórmula infantil para soja) foi referida por 16 pacientes (20,77%).

Tabela 12 - Tratamentos referidos durante o seguimento tardio (três, seis e 12 meses) após episódio inicial.

Tratamento	Entrevista 3 meses (n=71) n (%)	Entrevista 6 meses (n=71) n (%)	Entrevista 12 meses (n=69) n (%)
Nebulizações			
Berotec	15 (21,12%)	16 (22,53%)	17 (25,00%)
Atrovent	6 (8,45%)	5 (7,04%)	7 (10,29%)
Aerolin	0 (0%)	1 (1,40%)	4 (5,88%)
Solução fisiológica	24 (33,80%)	20 (28,16%)	18 (26,47%)
Corticosteróide	17 (23,94%)	20 (28,16%)	25 (36,76%)
Uso de nebulímetro			
Broncodilatador	1 (1,40%)	0 (0%)	2 (2,94%)
Corticosteróide	3 (4,22%)	5 (7,04%)	5 (7,35%)
Corticosteróide + BD longa	2 (2,81%)	2 (2,81%)	1 (1,47%)
Montelukast	8 (11,26%)	13 (18,30%)	13 (19,11%)
Cetotifeno	1 (1,40%)	1 (1,40%)	4 (5,88%)
Antihistamínico	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Uso de antibióticos	14 (19,71%)	22 (30,98%)	32 (47,05%)
Dieta (exclusão LV)	7 (9,85%)	10 (14,08%)	9 (13,23%)
Tratamento alternativo	4 (5,63%)	10 (14,08%)	10 (14,70%)
Recebeu vacina Prevenar	66 (92,95%)	63 (88,73%)	60 (88,23%)

BD: broncodilatador LV: leite de vaca

Levando em conta as respostas aos questionários e o relato de uso de profilaxia para asma por indicação médica, verificamos que 43 pacientes (55,84%)

poderiam ser considerados como chiadores recorrentes por um ou outro critério. As características dos pacientes que cursaram ou não com chiado recorrente estão apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Características dos pacientes que cursaram ou não com chiado recorrente e/ou diagnóstico médico de asma (MD asma).

Característica	Chiado recorrente n=43	Sem chiado recorrente n=26	p
Idade episódio inicial	7,17±4,34	7,2±5,37	0,35*
Prematuridade	3 (6,97%)	5 (19,23%)	0,12 [#]
Sexo Masculino	28 (65,11%)	17 (65,38%)	0,98 ^{&}
Antecedente familiar asma	20 (46,51%)	8 (30,76%)	0,19 ^{&}
Antecedente familiar rinite	23 (53,48%)	17 (65,38%)	0,33 ^{&}
Antecedente familiar atopia	30 (69,76%)	18 (69,23%)	0,96 ^{&}
Fumantes em casa	9 (20,93%)	3 (11,53%)	0,25 [#]
Escore gravidade	6,48±2,2	6,13±2,6	0,21*
Internação	16 (37,20%)	10 (38,46%)	0,91 ^{&}
Creche	9 (20,93%)	1 (3,84%)	0,077 [#]

* Teste de Mann Whitney

[#] Teste exato de Fisher

[&] Qui quadrado

As variáveis investigadas para determinação de associação com o desfecho de chiado recorrente foram idade, sexo, antecedente de prematuridade (idade gestacional <37 semanas), ser filho único, freqüentar creche, ter pai, mãe ou familiar 1º grau com rinite, asma ou dermatite atópica, ter pai, mãe ou outro fumante em casa, presença de cães ou gatos em casa, ter sido internado ou admitido em Semi-UTI e ter um resultado positivo para os seguintes vírus: VSR, hMPV, rinovírus, influenza A, enterovírus, bocavírus e parainfluenza 3. Na análise univariada, a freqüência a Creche associou-se como fator de risco com significância limítrofe para o desfecho (OR= 6,8, $p=0,07$), mas outras cinco variáveis apresentaram $p<0,25$ e foram incluídas na análise multivariada (prematuridade, mãe com atopia, familiar com asma, gato e enterovírus). Na análise multivariada nenhum fator esteve associado com chiado recorrente ou diagnóstico médico de asma.(Tabela 14)

Tabela 14 - Regressão logística binária univariada e multivariada tendo como desfecho primário chiado recorrente.

Variável	Análise univariada				Análise multivariada			
	OR	IC 95%		p	OR	IC 95%		p
Idade	0,999	[0,900	1,108]	0,980				
Sexo masculino	0,988	[0,355	2,748]	0,982				
Prematuridade	0,315	[0,069	1,448]	0,138	0,255	[0,030	2,175]	0,211
Filho único	0,756	[0,265	2,158]	0,601				
Escore chiado	1,065	[0,857	1,324]	0,568				
Pai c/ atopia	0,756	[0,265	2,158]	0,601				
Mãe c/ atopia	2,250	[0,804	6,298]	0,123	1,619	[0,478	5,484]	0,439
Familiar c/ atopia	0,972	[0,324	2,921]	0,960				
Pai c/ rinite	0,598	[0,195	1,831]	0,367				
Mãe c/ rinite	1,138	[0,406	3,187]	0,806				
Familiar c/ rinite	0,601	[0,212	1,705]	0,339				
Pai c/ asma	1,263	[0,215	7,435]	0,796				
Mãe c/ asma	1,952	[0,549	6,936]	0,301				
Familiar c/ asma	2,045	[0,730	5,728]	0,173	1,991	[0,624	6,358]	0,245
Pai c/ dermatite	1,923	[0,189	19,534]	0,580				
Mãe c/ dermatite	1,036	[0,226	4,751]	0,964				
Familiar c/ dermatite	0,614	[0,202	1,866]	0,389				
Pai fumante	2,400	[0,459	12,561]	0,300				
Mãe fumante	2,632	[0,278	24,935]	0,399				
Fumante em casa	2,091	[0,510	8,572]	0,306				
Cachorro	0,848	[0,277	2,601]	0,773				
Gato	0,179	[0,018	1,823]	0,146	0,311	[0,023	4,172]	0,378
Creche/escola	6,818	[0,810	57,394]	0,077	6,814	[0,729	63,687]	0,092
Internação	0,948	[0,348	2,586]	0,917				
Internação Semi-UTI	0,374	[0,058	2,404]	0,300				
VSR	0,735	[0,268	2,019]	0,551				
influenza A	0,595	[0,036	9,943]	0,718				
rinovírus	1,333	[0,473	3,762]	0,587				
hMPV	1,069	[0,281	4,076]	0,922				
hBoV	2,333	[0,446	12,200]	0,315				
enterovirus	2,968	[0,750	11,742]	0,121	2,481	[0,535	11,515]	0,246
parainfluenza 3	2,564	[0,271	24,281]	0,412				

OR: odds ratio IC: intervalo de confiança

VSR: vírus sincicial respiratório hMPV: metapneumovírus humano hBOV: bocavírus humano

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram uma alta taxa de identificação viral em lactentes no primeiro episódio de bronquiolite, sendo o VSR o principal agente detectado e um grande número de pacientes apresentando co-deteção viral. Observamos uma taxa de internação ao redor de 40%, e a maior parte dos pacientes internados tinha o VSR como um dos agentes envolvidos. Estes achados indicam que a utilização de métodos de biologia molecular modifica significativamente o panorama etiológico, mas o VSR continua sendo o agente de maior relevância clínica para pacientes com bronquiolites moderadas e graves, que motivam idas a Unidades de Emergência e admissão hospitalar.

A alta positividade de detecção de pelo menos um agente em nossas amostras está relacionada à alta sensibilidade dos métodos de biologia molecular para detecção dos vírus pesquisados. Estudos que empregaram cultura viral e imunofluorescência relatam positivities entre 50 e 70% (101) com identificação de no máximo 5 agentes etiológicos, pela dificuldade no isolamento de patógenos como rinovírus, enterovírus e coronavírus humano. Além disso, vírus com descrição recente, como metapneumovírus humano (para o qual já existem anticorpos monoclonais para detecção por imunofluorescência (102)) e bocavírus humano têm sua detecção mais confiável com o emprego de métodos de biologia molecular. Cabe ressaltar que o bocavírus humano, descrito inicialmente em 2005 (103), sequer foi isolado em cultura ou visualizado em tecidos humanos, ou seja, depende exclusivamente de métodos de detecção do genoma para sua caracterização.

A multiplicidade de agentes etiológicos possíveis é um dos obstáculos na aplicação prática de métodos moleculares para o diagnóstico etiológico em infecções

respiratórias agudas como a bronquiolite; a positividade variável dos estudos que empregaram biologia molecular certamente está relacionada ao número de alvos pesquisados. Thomazzelli e colaboradores publicaram em 2005 um estudo de etiologia de infecções respiratórias agudas utilizando a revelação de produtos de RT-PCR e PCR em seqüenciador automatizado, com o software Genescan® e relataram positividade ao redor de 55% (22). Não houve, entretanto, pesquisa de rinovírus, enterovírus, coronavírus humano e bocavírus humano, o que pode justificar a diferença de positividade em relação ao nosso estudo, além do fato destes autores terem incluído uma população mais heterogênea (idade até cinco anos, inclusão de pacientes com pneumonia) do que a que avaliamos. Mais recentemente, outros estudos de pesquisa etiológica em bronquiolites virais agudas tem relatado taxas de identificação semelhantes à observada em nosso estudo, na casa dos 90% (80;104;105), demonstrando a superioridade dos métodos de biologia molecular para detecção de vírus respiratórios.

De modo análogo ao que ocorre com a positividade geral das amostras, o número de pacientes com co-deteção viral é também influenciado pelos de métodos empregados e número de agentes pesquisados, de tal modo que observamos taxas variando de 10 a 30% (77;80;106) na literatura. Um dado relevante que reforça a influência do método é o fato de que o estudo de maior frequência de co-deteções (80) utilizou exatamente a mesma técnica escolhida por nós na detecção de rinovírus e enterovírus. A técnica em questão, RT-PCR em tempo real, tem sensibilidade superior à RT-PCR convencional com detecção de amplicómeros por eletroforese (92;100) utilizada em boa parte dos estudos de etiologia viral. Apesar de alguns autores relatarem diferenças em relação ao impacto clínico de infecções únicas ou combinadas por vírus respiratórios (31;77), o assunto ainda é

bastante controverso e não há uma definição clara na literatura (37). Tendo em vista a casuística a alta frequência de co-deteções, não foi possível avaliar o efeito deste aspecto para todas as combinações, mas avaliando infecções únicas ou múltiplas envolvendo o VSR não verificamos qualquer diferença nos desfechos avaliados. No recente estudo de Marguet e colaboradores, os autores também não encontraram quadros mais graves entre os pacientes com associação de VSR com rinovírus (37).

Além do aspecto da técnica empregada na identificação viral, existem ainda evidências de que existe associação entre a intensidade da infecção respiratória aguda e a positividade das amostras e o tipo de vírus identificado. No estudo americano *COAST (Childhood Origins of Asthma)*, uma coorte de crianças com alto risco de asma, Lemanske e colaboradores relataram que a positividade foi significativamente maior nos pacientes com infecções respiratórias agudas moderadas e graves, grupo que também exibiu a maior participação do VSR como agente etiológico principal (87). Nosso estudo foi realizado em uma Unidade de Pronto Atendimento, refletindo, portanto uma maior gravidade dos pacientes. De fato, verificamos uma alta proporção de pacientes com escore de gravidade moderado e uma alta taxa de internação (cerca de 40%), o que justifica tanto a alta positividade que encontramos quanto a grande participação do VSR como agente etiológico.

Quanto à distribuição dos diversos agentes etiológicos, observamos que o rinovírus foi o segundo agente etiológico mais identificado. Pitrez e colaboradores, em Porto Alegre, descreveram o rinovírus como segundo agente etiológico em bronquiolites, mas é preciso salientar que apenas este agente foi pesquisado através de métodos de biologia molecular e outros agentes como hMPV, hCoV e hBoV não foram investigados (38). Vários outros estudos internacionais apontam

para a importância do rinovírus como agente etiológico em bronquiolite viral aguda (107;108), mas há controvérsias quanto ao impacto clínico imediato deste agente (31;37;80). No presente estudo, o rinovírus foi o agente mais comum entre os lactentes não hospitalizados, sugerindo que este pode ser um patógeno freqüentemente encontrado em lactentes com quadro clínicos mais leves, como observado também no estudo *COAST* (87) e em outros estudos mais recentes (36;37).

Desfechos precoces: internação:

Os desfechos escolhidos para avaliar o impacto imediato das infecções virais foram internação hospitalar e admissão em UTI. Decidimos não incluir como desfechos dados como tempo de uso de oxigênio ou evolução do escore de gravidade por questões operacionais, pois os pacientes não foram acompanhados pela equipe do estudo durante a internação e consideramos que poderia haver viés significativo na interpretação destes dados.

A taxa de hospitalização do nosso estudo foi relativamente alta (41,5%), mas outros estudos apontam taxas entre 20 e 50% (15;109). Índices de hospitalização tão altos estão relacionados ao tipo de paciente e local de realização do estudo. Estudos conduzidos em Unidades de Emergência ou Pronto-Atendimentos costumam relatar taxas de admissão hospitalar mais altas, enquanto estudos populacionais mostram taxas de 1,5% a 2% aproximadamente (8;57).

Nossa análise estatística inicial apontou apenas a identificação de VSR como fator significativo, com um *odds ratio* de 4,1 ($p=0,009$). Entretanto, após ajuste com outras variáveis explicativas, os fatores associados a um maior risco de internação

hospitalar foram baixa idade e identificação de enterovírus, enquanto atopia familiar foi identificada como um fator de proteção.

Com relação à idade, nosso estudo mostrou que quanto mais jovem o lactente maior o risco de internação. Vários estudos confirmam este achado, mostrando que entre as crianças internadas com bronquiolite viral aguda existe uma maior proporção de lactentes abaixo dos seis meses de idade (61;104). A bronquiolite viral aguda é uma doença obstrutiva das vias aéreas, e sabe-se que o calibre das vias aéreas (que é proporcional à idade) representa um aspecto crítico na resistência ao fluxo aéreo (110). Além disso, crianças mais jovens têm maior complacência da caixa torácica, menor ventilação colateral (menor número de poros de Kohn e canais de Lambert) e maior risco de fadiga respiratória frente ao agravo infeccioso (111).

Outra variável que apresentou associação com maior risco de hospitalização foi identificação do enterovírus, com um *odds ratio* de 6 ($p=0,027$). Este achado foi curioso, pois os enterovírus foram identificados preferencialmente em co-detecção com VSR, o que poderia sugerir algum efeito de associação entre as duas etiologias. Os picornavírus vêm ganhando destaque na literatura nos últimos anos, porém, um enfoque muito maior é dado ao rinovírus em relação aos enterovírus. Isto ocorre, provavelmente, devido à incidência do rinovírus ser maior e este já ter confirmação de alguns estudos da sua associação com chiado recorrente e asma (87-89). Em um estudo conduzido na França para investigação de infecções por enterovírus, os autores relatam que o principal diagnóstico das infecções respiratórias por este agente foi bronquiolite, e descrevem ainda taxa de internação de 62%, reforçando nosso achado de risco de internação para pacientes com identificação de enterovírus (34).

Outro achado do estudo, o aspecto de proteção de atopia familiar para o desfecho de internação (OR: 0,202; $p= 0,021$), também tem sido relatado por outros autores. Bradley e colaboradores também observaram menor risco para hospitalização em crianças com história de atopia familiar, pois estas apresentavam valores maiores de saturação de oxigênio em relação às que não apresentavam atopia familiar (58). Porém, um estudo publicado em 2000 mostrou que crianças com atopia familiar tiveram maior chance de hospitalização, maior tempo de internação e maior frequência de bronquiolite (71). Singh e colaboradores relataram, em uma revisão que enfocou a interface entre bronquiolite e asma, que não há evidências de associação entre atopia familiar e gravidade da bronquiolite (91).

Um aspecto relevante é que observamos uma alta proporção de pacientes com antecedentes familiares de atopia (72,7%), o que pode estar relacionado ao alto nível sócio-econômico da população avaliada. Pereira e colaboradores mostraram risco aumentado de atopia entre crianças de famílias com melhores níveis socioeconômicos e de escolaridade, e ainda menores taxas de sensibilização atópica entre crianças com infecção por parasitas intestinais, o que geralmente reflete uma condição socioeconômica desfavorável (112).

Ainda com relação ao desfecho de admissão hospitalar, verificamos menor taxa de internação no grupo de lactentes não incluídos no estudo (com critérios clínicos de inclusão), o que pode ser explicado em parte por questões operacionais. Idealmente a inclusão no estudo deveria ser feita antes de qualquer decisão quanto à admissão hospitalar, mas dado o grande número de pediatras envolvidos no atendimento, a notícia da necessidade de hospitalização pode ter sido antecipada para alguns familiares antes da inclusão no estudo. A ciência dos pais e/ou responsáveis da necessidade de internação da criança pode ter resultado numa

maior aceitação para inclusão no estudo. Dentre os motivos de não inclusão de pacientes, a maior parte esteve relacionada ao horário de atendimento fora do período de coleta, mas pacientes com quadro clínico mais leve podem ter recusado a inclusão no protocolo pela perspectiva de maior tempo de permanência na Unidade para preenchimento dos questionários e coleta da amostra de aspirado nasofaríngeo.

Desfechos precoces: internação em UTI:

Na análise dos fatores associados ao maior risco de admissão em terapia intensiva verificamos que a prematuridade resultou em risco significativamente maior (OR= 24,512; $p=0,002$). A idade dos pacientes admitidos em terapia intensiva foi significativamente menor na avaliação da distribuição das idades através de teste não paramétrico, mas este aspecto não teve significado estatístico na regressão logística. Lactentes mais jovens e prematuros requerem monitorização mais cuidadosa devido à labilidade clínica, o que poderia justificar risco aumentado para internação em terapia intensiva. Além disso, há evidências de que o nascimento prematuro resulta em redução de fluxos expiratórios forçados (113;114), e esta redução parece persistir pelo menos nos primeiros dois anos de vida (115), o que teoricamente aumentaria o risco de sibilância com repercussões clínicas mais significativas. Outro aspecto envolvido é o risco de apnéias que esta população apresenta, principalmente na vigência de quadros infecciosos, o que resulta com frequência na admissão em Unidade com recursos de monitorização cardio-respiratória (116). Vale ressaltar, entretanto, que a magnitude do efeito atribuído a prematuridade no teste estatístico (OR= 24,512; $p=0,002$) deve ser vista com

restrições, pois pode estar associada ao tamanho da amostra e pelo fato de somente oito lactentes terem sido admitidos em unidade de terapia intensiva.

Outro aspecto a se comentar é o fato de não termos observado óbitos ou necessidade de ventilação mecânica invasiva (com intubação orotraqueal) em nossa casuística. Apenas dois pacientes (com antecedente de prematuridade) necessitaram de ventilação mecânica não invasiva, e este aspecto pode refletir melhores condições sociais e de saúde da população avaliada ou uma abordagem clínica inicial mais adequada. Greenough e colaboradores relatam necessidade de ventilação mecânica (invasiva ou não invasiva) numa proporção de 1 a 5% dos lactentes com bronquiolite viral aguda, que aumenta para 8 a 27% em casos de antecedente de prematuridade (117). De qualquer modo, a admissão em terapia intensiva resultou num tempo significativamente maior de hospitalização (6,4 dias x 3,9 dias, $p=0,012$), o que indica que de fato estes pacientes apresentavam maior gravidade clínica.

Desfechos tardios (chiado recorrente):

Neste estudo, decidimos ainda pelo seguimento dos pacientes através de entrevistas telefônicas para conhecer a evolução posterior destes lactentes em relação à sintomatologia respiratória. Nenhuma das variáveis explicativas analisadas apresentou associação significativa com chiado recorrente no seguimento de um ano, manifestação presente em uma alta proporção dos pacientes (56%). No estudo de Pitrez e colaboradores, em Porto Alegre, os autores relatam que 73% dos lactentes persistiram com sibilância recorrente no seguimento de um ano (38). Em outro estudo, entretanto, Bosis e colaboradores relataram apenas 10% dos

pacientes com mais de um episódio de chiado no seguimento, mas o período desta avaliação foi de apenas seis meses (104).

O seguimento de apenas um ano certamente foi o principal entrave para investigação da hipótese aventada, visto que o diagnóstico de asma é de difícil caracterização em faixas etárias como a que avaliamos. No estudo de coorte da Suécia, entretanto, Sigurs e colaboradores (85) relataram o impacto da hospitalização com VSR já no 1º ano de seguimento, com uma taxa de sibilância ao redor de 40% neste momento. Outros estudos de coorte que investigam as origens da asma, com resultados recentemente publicados, definem este diagnóstico aos três e seis anos de idade (87-89). Além disso, a ocorrência da bronquiolite viral aguda com intensidade moderada ou grave, independentemente da etiologia, aparentemente acarreta, por si só, um risco aumentado para o desenvolvimento de sibilância recorrente (57;87;112). Deste modo, poderíamos esperar que boa parte dos nossos pacientes continuasse a apresentar episódios de sibilância, qualquer que fosse a etiologia identificada. Uma das perspectivas de continuação deste nosso estudo, neste sentido, seria uma reavaliação dos pacientes em três a cinco anos para tentar definir de forma mais consistente o diagnóstico de asma, usando exames laboratoriais para atopia e testes de função pulmonar.

Apesar do período relativamente curto de seguimento, pudemos constatar uma tendência ao maior risco de chiado no grupo de crianças que freqüentavam creche por ocasião da inclusão (OR: 6,8; $p=0,077$). Vale ressaltar que um pequeno número de pacientes (13 crianças, 16,8%) freqüentava creche, refletindo uma vez mais o alto nível sócio-econômico da população incluída. Frente ao risco maior de infecções virais recorrentes, a tendência observada parece bastante justificável dentro do período avaliado e tem sido relatada por outros autores (118). A idéia de

que esta exposição precoce e intensiva aos vírus respiratórios poderia, em contrapartida, trazer um efeito protetor para asma posterior foi refutada em estudo recente publicado por Caudri e colaboradores (118).

Uma das limitações do presente estudo é que o desfecho tardio de chiado recorrente foi baseado em entrevistas telefônicas. A ambigüidade de interpretação dos sintomas respiratórios por parte do entrevistado é um fator de confusão que pode ocorrer neste tipo de acompanhamento.

Um estudo que avaliou exatamente a confiabilidade na interpretação do termo “chiado” ou “sibilância” por parte dos pais, realizado na Suíça, mostrou que 83,5% dos pais identificou adequadamente o termo sibilância ao ruído expiratório típico (119). Um achado interessante foi que o acerto na interpretação foi maior entre pais com crianças chiadoras, história materna de asma e maior grau de escolaridade (119). Tendo em vista as características a população que incluímos no estudo, de alto nível sócio econômico e alta prevalência de atopia, podemos inferir uma maior probabilidade de acerto na resposta às entrevistas telefônicas.

Saglani e colaboradores, em um estudo de biópsias endobrônquicas de lactentes e pré-escolares com chiado recorrente, aplicaram um vídeo-questionário para os pais a fim de se certificar que as crianças apresentavam sibilância de fato (120). Analisando a espessura da membrana basal reticular da via aérea destas crianças, observou diferença significativa apenas entre os chiadores confirmados pelo vídeo-questionário em comparação aos controles, não observando diferenças no grupo de chiadores “relatados” (120). Este resultado corrobora a idéia de que o simples relato da sibilância pode não ser confiável, e que o uso de instrumentos áudios-visuais pode auxiliar numa caracterização mais precisa.

No nosso estudo, procuramos minimizar o viés do questionário telefônico através de três estratégias, a inclusão de perguntas mais dirigidas à característica dos ruídos percebidos pelos pais e/ou responsáveis, como a pergunta se o barulho era de “chiado ou ronqueira”; a utilização de um único entrevistador em todas as entrevistas e a inclusão de perguntas sobre tratamentos em curso, com enfoque especial em drogas para rinite e asma.

Estudos futuros poderiam incluir um vídeo-questionário no momento da inclusão ou ainda como recurso adicional em uma plataforma baseada em Internet para melhorar a qualidade da informação obtida dos pais.

Com relação ao tratamento empregado durante o seguimento, a baixa taxa de utilização dos nebulímetros e a grande utilização de Montelukast reflete a preferência dos pediatras por drogas de uso oral. Outro ponto a ser comentado foi à troca da fórmula infantil pela soja em 20% dos entrevistados, sem confirmação diagnóstica de alergia à proteína do leite de vaca, mostrando que reciclagens periódicas por parte de pediatras generalistas são extremamente necessárias.

A realização de um estudo de coorte parte da premissa de seguimento dos casos ao longo do tempo, e idealizamos por ocasião do planejamento do estudo uma perda pequena frente às características da população avaliada (alto nível sócio-econômico, residência e telefones próprios, etc). Entretanto, verificamos uma perda razoável de pacientes (11,68%) durante o seguimento, provavelmente relacionada a mudanças de endereço e/ou cidade. Uma das possibilidades para esta ocorrência é de que os intervalos entre as entrevistas tenham sido muito grandes a partir dos 30 dias após inclusão, e possivelmente num novo estudo recomendaríamos contatos telefônicos quinzenais ou mensais para evitar este fato.

Uma perspectiva do presente estudo é uma reavaliação desta população em um momento posterior, buscando uma consolidação do diagnóstico de asma. Estes pacientes poderiam ser submetidos a testes laboratoriais para avaliar sensibilização atópica e testes funcionais para avaliar obstrução de vias aéreas e resposta a broncodilatadores.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Uma alta taxa de identificação viral foi encontrada (93,5%), com alta frequência de co-deteccões (44%). O vírus sincicial respiratório foi o principal agente identificado (64%), seguido pelo rinovírus (34%).
2. A maior parte das etiologias virais, exceto o VSR, foi encontrada em co-deteccão e não infecção isolada.
3. Admissão hospitalar ocorreu em 41,5% dos casos, e os fatores de risco identificados para este desfecho foram idade ($OR=0,838$, $p=0,026$) e identificação de enterovírus ($OR= 6,033$ $p=0,027$). O VSR, principal agente identificado entre as crianças internadas, teve associação com este desfecho apenas na análise univariada ($OR=4,145$, $p=0,009$). Atopia familiar foi associada a um efeito protetor para internação hospitalar ($OR=0,202$, $p=0,021$);
4. Prematuridade foi associada a um risco significativo para admissão em UTI ($OR=24,512$ $p=0,002$), mas a intensidade deste achado pode ser superestimada em função do pequeno número de pacientes admitidos na UTI;
5. Durante o seguimento de doze meses, a taxa de retenção no estudo foi de 89,6% dos pacientes; cerca de metade destes (56%) apresentou chiado recorrente;
6. Nenhum fator de risco ou etiologia viral foi associado ao desfecho de chiado recorrente no modelo de regressão logística uni e multivariada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- (1) Laitinen A, Laitinen LA. Airway morphology: epithelium/basement membrane. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 ;150(5 Pt 2):S14-S17.
- (2) Gaillard D, Jouet JB, Egreteau L, Plotkowski L, Zahm JM, Benali R, et al. Airway epithelial damage and inflammation in children with recurrent bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 ;150(3):810-7.
- (3) Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* 1999 ;282(15):1440-6.
- (4) Pecchini R, Berezin EN, Felicio MC, Passos SD, Souza MC, Lima LR, et al. Incidence and clinical characteristics of the infection by the respiratory syncytial virus in children admitted in Santa Casa de Sao Paulo Hospital. *Braz J Infect Dis* 2008 ;12(6):476-9.
- (5) Paramore LC, Ciuryla V, Ciesla G, Liu L. Economic impact of respiratory syncytial virus-related illness in the US: an analysis of national databases. *Pharmacoeconomics* 2004;22(5):275-84.
- (6) Mallory MD, Shay DK, Garrett J, Bordley WC. Bronchiolitis management preferences and the influence of pulse oximetry and respiratory rate on the decision to admit. *Pediatrics* 2003 ;111(1):e45-e51.
- (7) Langley JM, Wang EE, Law BJ, Stephens D, Boucher FD, Dobson S, et al. Economic evaluation of respiratory syncytial virus infection in Canadian children: a Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study. *J Pediatr* 1997 ;131(1 Pt 1):113-7.
- (8) Pelletier AJ, Mansbach JM, Camargo CA, Jr. Direct medical costs of bronchiolitis hospitalizations in the United States. *Pediatrics* 2006 ;118(6):2418-23.
- (9) Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol* 2007 10.
- (10) Hall CB, Stevens TP, Swantz RJ, Sinkin RA, McBride JT. Development of local guidelines for prevention of respiratory syncytial viral infections. *Pediatr Infect Dis J* 1999 ;18(10):850-3.
- (11) Psarras S, Papadopoulos NG, Johnston SL. Pathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis-related wheezing. *Paediatr Respir Rev* 2004;5 Suppl A:S179-S184.
- (12) Leader S, Kohlhase K. Respiratory syncytial virus-coded pediatric hospitalizations, 1997 to 1999. *Pediatr Infect Dis J* 2002 ;21(7):629-32.

-
- (13) Deshpande SA, Northern V. The clinical and health economic burden of respiratory syncytial virus disease among children under 2 years of age in a defined geographical area. *Arch Dis Child* 2003 ;88(12):1065-9.
- (14) Vieira SE, Stewien KE, Queiroz DA, Durigon EL, Torok TJ, Anderson LJ, et al. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001 ;43(3):125-31.
- (15) Calegari T, Queiroz DA, Yokosawa J, Silveira HL, Costa LF, Oliveira TF, et al. Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2005 ;9(2):156-61.
- (16) Moura FE, Borges LC, Portes SA, Ramos EA, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description of clinical and epidemiological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003 ;98(6):739-43.
- (17) Costa LF, Yokosawa J, Mantese OC, Oliveira TF, Silveira HL, Nepomuceno LL, et al. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlandia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006 ;101(3):301-6.
- (18) Nascimento JP, Siqueira MM, Suttmoller F, Krawczuk MM, de F, V, Ferreira V, et al. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991 ;33(4):287-96.
- (19) Stralioatto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha ML, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002 ;35(4):283-91.
- (20) Coelho MC, Tsuchiya LR, Nogueira MB, Pereira LA, Takahashi GA, Cruz CR, et al. Impact of respiratory infections by influenza viruses A and B in pediatrics patients from Federal University of Parana, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2007 ;11(2):220-3.
- (21) Izurieta HS, Thompson WW, Kramarz P, Shay DK, Davis RL, DeStefano F, et al. Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children. *N Engl J Med* 2000 27;342(4):232-9.
- (22) Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DB, Golono MA, et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 2007 ;83(5):422-8.
- (23) Louie JK, Acosta M, Winter K, Jean C, Gavali S, Schechter R, et al. Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California. *JAMA* 2009 4;302(17):1896-902.

-
- (24) Reed G, Jewett PH, Thompson J, Tollefson S, Wright PF. Epidemiology and clinical impact of parainfluenza virus infections in otherwise healthy infants and young children < 5 years old. *J Infect Dis* 1997 ;175(4):807-13.
- (25) Miyao CR, Gilio AE, Vieira S, Hein N, Pahl MM, Betta SL, et al. [Viral infections in hospitalized children affected by acute lower respiratory tract disease]. *J Pediatr (Rio J)* 1999 ;75(5):334-44.
- (26) Hong JY, Lee HJ, Piedra PA, Choi EH, Park KH, Koh YY, et al. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis* 2001 15;32(10):1423-9.
- (27) Straliotto SM, Siqueira MM, Machado V, Maia TM. Respiratory viruses in the pediatric intensive care unit: prevalence and clinical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004 ;99(8):883-7.
- (28) Bridges ND, Spray TL, Collins MH, Bowles NE, Towbin JA. Adenovirus infection in the lung results in graft failure after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998 ;116(4):617-23.
- (29) Colom AJ, Teper AM, Vollmer WM, Diette GB. Risk factors for the development of bronchiolitis obliterans in children with bronchiolitis. *Thorax* 2006 ;61(6):503-6.
- (30) Blomqvist S, Roivainen M, Puhakka T, Kleemola M, Hovi T. Virological and serological analysis of rhinovirus infections during the first two years of life in a cohort of children. *J Med Virol* 2002 ;66(2):263-8.
- (31) Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 1;165(9):1285-9.
- (32) 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 ;24(7):611-6.
- (33) Chung JY, Han TH, Kim SW, Hwang ES. Respiratory picornavirus infections in Korean children with lower respiratory tract infections. *Scand J Infect Dis* 2007;39(3):250-4.
- (34) Jacques J, Moret H, Minette D, Leveque N, Jovenin N, Deslee G, et al. Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *J Clin Microbiol* 2008 ;46(1):206-13.
- (35) van der Zalm MM, Uiterwaal CS, Wilbrink B, de Jong BM, Verheij TJ, Kimpen JL, et al. Respiratory pathogens in respiratory tract illnesses during the first year of life: a birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J* 2009 ;28(6):472-6.

-
- (36) Mansbach JM, McAdam AJ, Clark S, Hain PD, Flood RG, Acholonu U, et al. Prospective multicenter study of the viral etiology of bronchiolitis in the emergency department. *Acad Emerg Med* 2008 ;15(2):111-8.
- (37) Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, Le RP, Deschildre A, Forget C, et al. In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. *PLoS One* 2009;4(2):e4596.
- (38) Pitrez PM, Stein RT, Stuermer L, Macedo IS, Schmitt VM, Jones MH, et al. [Rhinovirus and acute bronchiolitis in young infants]. *J Pediatr (Rio J)* 2005 ;81(5):417-20.
- (39) Leung J, Esper F, Weibel C, Kahn JS. Seroepidemiology of human metapneumovirus (hMPV) on the basis of a novel enzyme-linked immunosorbent assay utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus. *J Clin Microbiol* 2005 ;43(3):1213-9.
- (40) Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 2004 1;38(7):983-90.
- (41) Kahn JS. Newly identified respiratory viruses. *Pediatr Infect Dis J* 2007 ;26(8):745-6.
- (42) Peiris JS, Tang WH, Chan KH, Khong PL, Guan Y, Lau YL, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 2003 ;9(6):628-33.
- (43) Wolf DG, Greenberg D, Kalkstein D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Saleh N, et al. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. *Pediatr Infect Dis J* 2006 ;25(4):320-4.
- (44) van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2004 ;23(1 Suppl):S25-S32.
- (45) Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005 1;191(3):382-6.
- (46) 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 ;41(9):872-4.
- (47) Pitkaranta A, Virolainen A, Jero J, Arruda E, Hayden FG. Detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus infections in acute otitis media by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Pediatrics* 1998 ;102(2 Pt 1):291-5.

-
- (48) Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *J Infect Dis* 2005 ;191(4):492-8.
- (49) Koetz A, Nilsson P, Linden M, van der HL, Ripa T. Detection of human coronavirus NL63, human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in children with respiratory tract infections in south-west Sweden. *Clin Microbiol Infect* 2006 ;12(11):1089-96.
- (50) Bastien N, Chui N, Robinson JL, Lee BE, Dust K, Hart L, et al. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *J Clin Microbiol* 2007 ;45(2):610-3.
- (51) Gagliardi TB, Iwamoto MA, Paula FE, Proenca-Modena JL, Saranzo AM, Criado MF, et al. Human bocavirus respiratory infections in children. *Epidemiol Infect* 2009 ;137(7):1032-6.
- (52) de Carvalho WB, Johnston C, Fonseca MC. [Acute bronchiolitis, an updated review]. *Rev Assoc Med Bras* 2007 ;53(2):182-8.
- (53) Prevention of respiratory syncytial virus infections: indications for the use of palivizumab and update on the use of RSV-IGIV. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee of Fetus and Newborn. *Pediatrics* 1998 ;102(5):1211-6.
- (54) Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr* 2003 ;143(5 Supl):S112-S117.
- (55) Farhat SC, Paulo RL, Shimoda TM, Conceicao GM, Lin CA, Braga AL, et al. Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. *Braz J Med Biol Res* 2005 ;38(2):227-35.
- (56) Jansson L, Nilsson P, Olsson M. Socioeconomic environmental factors and hospitalization for acute bronchiolitis during infancy. *Acta Paediatr* 2002;91(3):335-8.
- (57) Albernaz EP, Menezes AM, Cesar JA, Victora CG, Barros FC, Halpern R. [Risk factors associated with hospitalization for bronchiolitis in the post-neonatal period]. *Rev Saude Publica* 2003 ;37(4):485-93.
- (58) Bradley JP, Bacharier LB, Bonfiglio J, Schechtman KB, Strunk R, Storch G, et al. Severity of respiratory syncytial virus bronchiolitis is affected by cigarette smoke exposure and atopy. *Pediatrics* 2005 Jan;115(1):e7-14.
- (59) Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JM, et al. Local interferon-gamma levels during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection are associated with disease severity. *J Infect Dis* 2001 ;184(3):355-8.

-
- (60) Iwane MK, Edwards KM, Szilagyi PG, Walker FJ, Griffin MR, Weinberg GA, et al. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. *Pediatrics* 2004 ;113(6):1758-64.
- (61) Rietveld E, Vergouwe Y, Steyerberg EW, Huysman MW, de GR, Moll HA. Hospitalization for respiratory syncytial virus infection in young children: development of a clinical prediction rule. *Pediatr Infect Dis J* 2006 ;25(3):201-7.
- (62) Wang EE, Law BJ, Robinson JL, Dobson S, al JS, Stephens D, et al. PICNIC (Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada) study of the role of age and respiratory syncytial virus neutralizing antibody on respiratory syncytial virus illness in patients with underlying heart or lung disease. *Pediatrics* 1997 ;99(3):E9.
- (63) Resch B, Pasnocht A, Gusenleitner W, Muller W. Rehospitalisations for respiratory disease and respiratory syncytial virus infection in preterm infants of 29-36 weeks gestational age. *J Infect* 2005 ;50(5):397-403.
- (64) MacDonald NE, Hall CB, Suffin SC, Alexson C, Harris PJ, Manning JA. Respiratory syncytial viral infection in infants with congenital heart disease. *N Engl J Med* 1982 12;307(7):397-400.
- (65) Meberg A, Bruu AL. Respiratory syncytial virus infections in congenital heart defects--hospitalizations and costs. *Acta Paediatr* 2006 ;95(4):404-6.
- (66) Meert K, Heidemann S, Lieh-Lai M, Sarnaik AP. Clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections in healthy versus previously compromised host. *Pediatr Pulmonol* 1989;7(3):167-70.
- (67) Navas L, Wang E, de C, V, Robinson J. Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of Canadian children. *Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada. J Pediatr* 1992 ;121(3):348-54.
- (68) Glezen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. *J Pediatr* 1981 ;98(5):708-15.
- (69) Singh SP, Barrett EG, Kalra R, Razani-Boroujerdi S, Langley RJ, Kurup V, et al. Prenatal cigarette smoke decreases lung cAMP and increases airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 1;168(3):342-7.
- (70) Hanrahan JP, Tager IB, Segal MR, Tosteson TD, Castile RG, Van VH, et al. The effect of maternal smoking during pregnancy on early infant lung function. *Am Rev Respir Dis* 1992 ;145(5):1129-35.

-
- (71) Trefny P, Stricker T, Baerlocher C, Sennhauser FH. Family history of atopy and clinical course of RSV infection in ambulatory and hospitalized infants. *Pediatr Pulmonol* 2000 ;30(4):302-6.
- (72) Henrickson KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Pediatr Infect Dis J* 2004 ;23(1 Suppl):S6-10.
- (73) Salomon HE, Grandien M, Avila MM, Pettersson CA, Weissenbacher MC. Comparison of three techniques for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal aspirates from children with lower acute respiratory infections. *J Med Virol* 1989 ;28(3):159-62.
- (74) Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S. Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. *J Clin Microbiol* 2001 ;39(8):2779-83.
- (75) Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR, et al. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. *J Infect Dis* 2004 15;189(4):706-10.
- (76) Garbino J, Gerbase MW, Wunderli W, Deffernez C, Thomas Y, Rochat T, et al. Lower respiratory viral illnesses: improved diagnosis by molecular methods and clinical impact. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 1;170(11):1197-203.
- (77) Calvo C, Garcia-Garcia ML, Blanco C, Vazquez MC, Frias ME, Perez-Brena P, et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *J Clin Virol* 2008 ;42(3):268-72.
- (78) 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 ;23(11):1003-7.
- (79) Bonzel L, Tenenbaum T, Schroten 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 ;27(7):589-94.
- (80) Miron D, Srugo I, Kra-Oz Z, Keness Y, Wolf D, Amirav I, et al. Sole Pathogen in Acute Bronchiolitis: Is There a Role for Other Organisms Apart From Respiratory Syncytial Virus? *Pediatr Infect Dis J* 2009 23.
- (81) Sims DG, Downham MA, Gardner PS, Webb JK, Weightman D. Study of 8-year-old children with a history of respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy. *Br Med J* 1978 7;1(6104):11-4.

-
- (82) Pullan CR, Hey EN. Wheezing, asthma, and pulmonary dysfunction 10 years after infection with respiratory syncytial virus in infancy. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982 ;5;284(6330):1665-9.
- (83) Ong GM, Wyatt DE, O'Neill HJ, McCaughey C, Coyle PV. A comparison of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for the diagnosis of respiratory infections in children with bronchiolitis, and the implications for a cohorting strategy. *J Hosp Infect* 2001 ;49(2):122-8.
- (84) Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999 ;354(9178):541-5.
- (85) Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ;161(5):1501-7.
- (86) Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 ;171(2):137-41.
- (87) Lemanske RF, Jr., Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005 ;116(3):571-7.
- (88) Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE, et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 ;178(7):667-72.
- (89) Kusel MM, de Klerk NH, Keadze T, Vohma V, Holt PG, Johnston SL, et al. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007 ;119(5):1105-10.
- (90) Gern JE. Viral respiratory infection and the link to asthma. *Pediatr Infect Dis J* 2004 ;23(1 Suppl):S78-S86.
- (91) Singh AM, Moore PE, Gern JE, Lemanske RF, Jr., Hartert TV. Bronchiolitis to asthma: a review and call for studies of gene-virus interactions in asthma causation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 15;175(2):108-19.
- (92) Deffernez C, Wunderli W, Thomas Y, Yerly S, Perrin L, Kaiser L. Amplicon sequencing and improved detection of human rhinovirus in respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2004 ;42(7):3212-8.
- (93) Raff T, van der GM, Endemann D, Wiederholt T, Paul M. Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. *Biotechniques* 1997 ;23(3):456-60.

-
- (94) van Elden LJ, van Loon AM, van der BA, Hendriksen KA, Hoepelman AI, van Kraaij MG, et al. Applicability of a real-time quantitative PCR assay for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol* 2003 ;41(9):4378-81.
- (95) Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004 ;42(4):1564-9.
- (96) Adachi D, Johnson G, Draker R, Ayers M, Mazzulli T, Talbot PJ, et al. Comprehensive detection and identification of human coronaviruses, including the SARS-associated coronavirus, with a single RT-PCR assay. *J Virol Methods* 2004 1;122(1):29-36.
- (97) Adachi D, Johnson G, Draker R, Ayers M, Mazzulli T, Talbot PJ, et al. Comprehensive detection and identification of human coronaviruses, including the SARS-associated coronavirus, with a single RT-PCR assay. *J Virol Methods* 2004 1;122(1):29-36.
- (98) Falsey AR, Formica MA, Treanor JJ, Walsh EE. Comparison of quantitative reverse transcription-PCR to viral culture for assessment of respiratory syncytial virus shedding. *J Clin Microbiol* 2003 ;41(9):4160-5.
- (99) Sarantis H, Johnson G, Brown M, Petric M, Tellier R. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* 2004 ;42(9):3963-9.
- (100) Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, Mackay IM, Sloots TP, Fry AM, et al. Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens. *J Clin Microbiol* 2006 ;44(9):3231-5.
- (101) Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, et al. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol* 2006 ;78(11):1498-504.
- (102) Ingram RE, Fenwick F, McGuckin R, Tefari A, Taylor C, Toms GL. Detection of human metapneumovirus in respiratory secretions by reverse-transcriptase polymerase chain reaction, indirect immunofluorescence, and virus isolation in human bronchial epithelial cells. *J Med Virol* 2006 ;78(9):1223-31.
- (103) Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 6;102(36):12891-6.
- (104) Bosis S, Esposito S, Niesters HG, Zuccotti GV, Marseglia G, Lanari M, et al. Role of respiratory pathogens in infants hospitalized for a first episode of

- wheezing and their impact on recurrences. *Clin Microbiol Infect* 2008 ;14(7):677-84.
- (105) Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr* 2009 ;98(1):123-6.
- (106) 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 ;24(7):605-10.
- (107) Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Osterback R, van den HB, Osterhaus AD, et al. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg Infect Dis* 2004 ;10(6):1095-101.
- (108) Jacques J, Bouscambert-Duchamp M, Moret H, Carquin J, Brodard V, Lina B, et al. Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. *J Clin Virol* 2006 ;35(4):463-6.
- (109) Alpern ER, Calello DP, Windreich R, Osterhoudt K, Shaw KN. Utilization and unexpected hospitalization rates of a pediatric emergency department 23-hour observation unit. *Pediatr Emerg Care* 2008 ;24(9):589-94.
- (110) Bates JH. Detecting airways obstruction from the tidal flow profile. *Eur Respir J* 1998 ;12(5):1008-9.
- (111) Respiratory mechanics in infants: physiologic evaluation in health and disease. American Thoracic Society/European Respiratory Society. *Am Rev Respir Dis* 1993 ;147(2):474-96.
- (112) Pereira MU, Sly PD, Pitrez PM, Jones MH, Escouto D, Dias AC, et al. Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *Eur Respir J* 2007 ;29(6):1154-60.
- (113) Friedrich L, Stein RT, Pitrez PM, Corso AL, Jones MH. Reduced lung function in healthy preterm infants in the first months of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 15;173(4):442-7.
- (114) Broughton S, Thomas MR, Marston L, Calvert SA, Marlow N, Peacock JL, et al. Very prematurely born infants wheezing at follow-up: lung function and risk factors. *Arch Dis Child* 2007 ;92(9):776-80.
- (115) Friedrich L, Pitrez PM, Stein RT, Goldani M, Tepper R, Jones MH. Growth rate of lung function in healthy preterm infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 15;176(12):1269-73.
- (116) Willwerth BM, Harper MB, Greenes DS. Identifying hospitalized infants who have bronchiolitis and are at high risk for apnea. *Ann Emerg Med* 2006 ;48(4):441-7.

- (117) Greenough A. Role of ventilation in RSV disease: CPAP, ventilation, HFO, ECMO. *Paediatr Respir Rev* 2009 ;10 Suppl 1:26-8.
- (118) Caudri D, Wijga A, Scholtens S, Kerkhof M, Gerritsen J, Ruskamp JM, et al. Early daycare is associated with an increase in airway symptoms in early childhood but is no protection against asthma or atopy at 8 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2009 15;180(6):491-8.
- (119) Michel G, Silverman M, Strippoli MP, Zwahlen M, Brooke AM, Grigg J, et al. Parental understanding of wheeze and its impact on asthma prevalence estimates. *Eur Respir J* 2006 ;28(6):1124-30.
- (120) Saglani S, Payne DN, Zhu J, Wang Z, Nicholson AG, Bush A, et al. Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 1;176(9):858-64.

ANEXOS

ANEXO 1

FOLHETO EXPLICATIVO PARA OS PAIS: “Etiologia, resposta inflamatória local e impacto clínico das infecções respiratórias virais em lactentes no 1º episódio de sibilância”

PROJETO DE PESQUISA NO PRONTO ATENDIMENTO DO HOSPITAL
ISRAELITA ALBERT EINSTEIN

“Etiologia, resposta inflamatória local e impacto clínico das infecções respiratórias virais em lactentes no 1º episódio de sibilância”

PORQUE ESTÃO FAZENDO ESTA PESQUISA?

Os VÍRUS RESPIRATÓRIOS são uma causa comum de problemas respiratórios em crianças, e possivelmente estão envolvidos na recorrência dos episódios de chiado e talvez até na origem da asma. Vários novos vírus estão sendo descobertos, e pouco se conhece sobre seu impacto em crianças.

Esta pesquisa pretende estudar os vírus (11 tipos diferentes) que acometem as crianças durante seu primeiro episódio de chiado no peito, com seus efeitos imediatos e tardios.

COMO VAI SER FEITA A PESQUISA?

Quando a equipe médica e de enfermagem do Hospital identificar uma criança que pode participar da pesquisa, um profissional de saúde pedirá autorização para os pais e/ou responsáveis e explicará em detalhes tudo o que vai ser feito: **uma entrevista inicial, o exame do paciente pelo pediatra, uma coleta de lavado nasal e 5 (cinco) entrevistas telefônicas posteriores, até um ano após a entrada no estudo.** Serão entrevistas rápidas, para obter informações sobre as consequências imediatas e tardias do episódio inicial de chiado.

O QUE É O LAVADO NASAL?

O lavado nasal é feito através de uma pequena sonda com soro fisiológico (“como uma lavagem do nariz com soro, só que aspirando o líquido de volta”).

O QUE VAI SER FEITO COM ESTE LAVADO NASAL?

A detecção dos vírus respiratórios e outros microrganismos, através de técnicas sofisticadas de detecção molecular (material genético) destes agentes. Além disso, substâncias presentes na inflamação serão quantificadas nestas mesmas amostras de lavado nasal, a fim de entender como o organismo reage às infecções por estes agentes.

QUEM VAI PAGAR POR ESTES EXAMES?

Bronquiolite viral aguda: etiologia e impacto clínico imediato e tardio em pacientes atendidos em um hospital privado de São Paulo

Esta pesquisa está sendo financiada pelo Hospital, e portanto estes exames serão realizados sem nenhum custo para familiares ou fontes pagadoras (convênios ou seguros de saúde).

É importante ressaltar, entretanto, que a pesquisa está restrita às entrevistas, coleta e análise do lavado nasal. A participação no estudo **NÃO IMPLICA** na realização de outro exame e **NÃO INTERFERE** nas decisões sobre os remédios necessários para o tratamento do problema atual (o médico do hospital que atender seu filho(a) ou seu médico particular decidirão por conta própria os procedimentos necessários para o tratamento (remédios, exames, etc). Estes procedimentos e/ou seus resultados, entretanto, serão registrados para análise futura.

MEU FILHO(A) PODE PARTICIPAR?

Serão selecionadas apenas as crianças até 2 ANOS DE IDADE com seu PRIMEIRO EPISÓDIO DE CHIADO.

O MÉDICO DO MEU FILHO(A) VAI SER INFORMADO DO ESTUDO E DOS RESULTADOS DOS EXAMES? EU VOU RECEBER ALGUM RESULTADO?

Se você desejar, o médico do seu filho(a) será informado de sua inclusão no estudo. Os resultados dos exames **NÃO** ESTARÃO DISPONÍVEIS RAPIDAMENTE, pois se trata de uma pesquisa com métodos complexos e trabalhosos. Se houver interesse, entretanto, O RESULTADO PODE SER ENVIADO para sua residência TÃO LOGO ESTEJA DISPONÍVEL, lembrando que isso poderá demorar bastante (você poderá assinalar esta opção no questionário inicial).

OS RESULTADOS DESTA PESQUISA SERÃO DIVULGADOS?

Sim, os pesquisadores pretendem publicar os resultados obtidos, mas o nome e dados pessoais dos pacientes são TOTALMENTE CONFIDENCIAIS (não haverá identificação dos participante

ANEXO 2

HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....

SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Etiologia, resposta inflamatória local e impacto clínico das infecções respiratórias virais em lactentes no 1º episódio de sibilância"

PESQUISADOR: Dr. Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO PEDIATRA / PNEUMOLOGISTA INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 69.437

UNIDADE DO HIAE: Unidade de Primeiro Atendimento / Clínica de Especialidades Pediátricas

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐RISCO MÍNIMO ☒RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 1 ano

III - EXPLICAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Motivo do estudo: Os vírus respiratórios são uma causa comum de problemas respiratórios em crianças, e possivelmente estão envolvidos na recorrência dos episódios de chiado e talvez até na origem da asma. Esta pesquisa pretende conhecer melhor os vírus e outros microrganismos que acometem as crianças durante seu primeiro episódio de chiado no peito. Pretende-se estudar, durante um ano, os episódios de infecção por vírus e suas consequências para as crianças durante seu primeiro episódio de chiado, como necessidade de internação, medicamentos como antibióticos e corticóides e a ocorrência posterior de novos episódios de chiado.

O que vai ser feito? O atendimento do seu filho(a) no Hospital será feito naturalmente, e todas as decisões do médico que atende no Hospital e/ou de seu pediatra nada tem a ver com o estudo. O procedimento adicional que o estudo propõe consiste de **coletar uma amostra de lavado nasal**, o que é feito através de uma pequena sonda com soro fisiológico ("como uma lavagem do nariz com soro, só que aspirando o líquido de volta"). Será nestas amostras de lavado nasal que se fará a pesquisa dos vírus respiratórios e outros microrganismos, através de técnicas sofisticadas de detecção molecular destes patógenos. **Estes exames serão realizados sem nenhum custo** para familiares ou fontes pagadoras (convênios ou seguros de saúde).

As outras medidas a que seu filho(a) será submetido são aquelas habitualmente realizadas na Unidade de Primeiro Atendimento do Hospital, como **avaliar o peso e estatura da criança, medir a oxigenação através do oxímetro de pulso** (aparelho que é colocado no dedo, sem nenhum incômodo) e o **exame pelo médico de plantão**. Além do exame de lavado nasal e anotação dos dados referidos acima, solicitaremos o **preenchimento**

Bronquiolite viral aguda: etiologia e impacto clínico imediato e tardio em pacientes em um hospital privado de São Paulo.

de um questionário simples de antecedentes familiares e da criança, e posteriormente entraremos em contato para entrevistas telefônicas dentro de 15 e 30 dias e depois aos 3, 6 e 12 meses após o episódio. Serão entrevistas rápidas, para obter informações sobre as consequências imediatas e tardias do episódio inicial de chiado.

Nenhum outro exame a que seu filho possa ser submetido (por exemplo, uma radiografia dos pulmões) **ou quaisquer medicações** que o médico do hospital ou seu médico julguem necessário **serão determinados pela participação no estudo, mas seu resultado poderá ser registrado para análise futura.**

O atendimento de seu filho(a) e coletas de lavado nasal serão feitos na própria Unidade de Primeiro Atendimento do Hospital, mas os resultados dos exames da amostra de lavado nasal NÃO estarão disponíveis para vocês ou seu médico imediatamente, pois trata-se de uma pesquisa. Se houver interesse, entretanto, existe nosso compromisso de ENVIAR O RESULTADO para sua residência TÃO LOGO O MESMO ESTEJA DISPONÍVEL, lembrando que isso poderá demorar bastante (você poderá assinalar esta opção no questionário inicial).

Além dos vírus, outros exames para investigação de inflamação ou de outros microrganismos, como bactérias, poderão ser realizados nas amostras de lavado nasal oportunamente.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

Fui informado que tal procedimento tem o risco **mínimo** da realização de qualquer coleta de lavado nasal, o **risco de provocar tosse ou vômito durante a coleta.**

As condutas necessárias a estes procedimentos bem como as intercorrências previsíveis (incômodo durante a coleta do lavado nasal, tosse ou vômito,) me foram devidamente esclarecidas pela equipe responsável.

POSSO, A QUALQUER MOMENTO, COMO RESPONSÁVEL PELO PACIENTE, SOLICITAR A INTERRUPÇÃO DE QUALQUER PROCEDIMENTO PREVISTO NO ESTUDO E, NESTA SITUAÇÃO, FICA GARANTIDA A CONTINUIDADE DO ATENDIMENTO SEM QUALQUER CONSEQUÊNCIA.

Declaro ainda que, TENDO CIÊNCIA QUANTO AOS PROCEDIMENTOS DE COLETA DE EXAMES a que será submetido, **AUTORIZO A PARTICIPAÇÃO DO MEU FILHO(A) NESTA PESQUISA.**

V. INFORMAÇÕES DO RESPONSÁVEL PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dr. Luiz Vicente Ferreira da Silva Filho – médico da Unidade de Primeiro Atendimento e da Clínica de Especialidades Pediátricas do HIAE (Pneumologia)

Tels. 3747-0200 / 3747-2255

Bip: 3444-4545 código 95990

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Bronquiolite viral aguda: etiologia e impacto clínico imediato e tardio em pacientes em um hospital privado de São Paulo.

ANEXO 3

QUESTIONÁRIO APLICADO AOS PAIS: “Etiologia, resposta inflamatória local e impacto clínico das infecções respiratórias virais em lactentes no 1º episódio de sibilância”

Identificação do Responsável:

NOME: _____

Grau de parentesco: _____

ANTECEDENTES DA FAMÍLIA E DO SEU FILHO(A) ANTES DO EPISÓDIO ATUAL:

Tem irmãos?	☐ NÃO	☐ SIM	relacione as idades: _____	
Familiares com alergia?	☐ PAI	☐ MÃE	☐ IRMÃO	☐ NÃO
Rinite alérgica?	☐ PAI	☐ MÃE	☐ IRMÃO	☐ NÃO
Asma ou bronquite?	☐ PAI	☐ MÃE	☐ IRMÃO	☐ NÃO
Dermatite alérgica (eczema)?	☐ PAI	☐ MÃE	☐ IRMÃO	☐ NÃO
Fumantes?	☐ PAI	☐ MÃE	☐ OUTROS	☐ NÃO
Quantas crianças em casa (além do paciente)?	☐ 0	☐ 1	☐ 2	☐ 3 ☐ mais de 3
Animais em casa?	☐ NÃO	☐ CÃO	quantos: ☐ GATO	quantos: _____
Frequente berçário/escola?	☐ SIM	☐ NÃO	☐ ½ período	☐ Integral
Seu filho(a) tem espirros frequentes?	☐ SIM	☐ NÃO	☐ NÃO SEI	
Seu filho(a) tem obstrução nasal por mais de 15 dias?	☐ SIM	☐ NÃO	☐ NÃO SEI	
Seu filho(a) tem prurido nasal?	☐ SIM	☐ NÃO	☐ NÃO SEI	
Seu filho(a) tem “alergia na pele”?	☐ SIM	☐ NÃO	☐ NÃO SEI	
Relacionada a picada de inseto?	☐ SIM	☐ NÃO	☐ NÃO SEI	
Tipo de parto? ☐ normal ☐ cesárea				
☐ rotura prematura de membranas		quanto tempo? _____		
Doenças associadas:				
☐ prematuridade	Quantas semanas? _____	Peso de Nascimento? _____		
	Necessitou respirador artificial?	☐ SIM	☐ NÃO	
	Displasia broncopulmonar?	☐ SIM	☐ NÃO	
☐ problemas cardíacos				
☐ malformações				
☐ outra doença pulmonar preexistente - cite _____				
☐ imunodeficiência				
☐ refluxo gastroesofágico				
() outras: _____				
Leite materno:	☐ NÃO	☐ SIM	até quantos meses: _____	
Recebeu vacina de gripe?	☐ NÃO	☐ SIM		

Bronquiolite viral aguda: etiologia e impacto clínico imediato e tardio em pacientes atendidos em um hospital privado de São Paulo.

Alguma vez já teve chiado no peito?	☐ SIM	☐ NÃO
Alguma vez na vida já usou inalação (nebulização) ou por via oral remédios como berotec, aerolin, salbutamol, brycanil, bambec?	☐ SIM	☐ NÃO
Já fez uso de alguma "bombinha de asma"?	☐ SIM	☐ NÃO
Costuma ter muito catarro no peito (peito cheio)?	☐ SIM	☐ NÃO
Já teve tosse rouca (ladrante ou "de cachorro")?	☐ SIM	☐ NÃO
Já usou remédios como predsim, prelone, prednisolon, decadron, celestamine, celestone por problemas de tosse/catarro?	☐ SIM	☐ NÃO
Este é o 1º episódio de chiado do seu filho?	☐ NÃO	☐ SIM

DADOS DO EPISÓDIO ATUAL:

Quando começaram os sintomas? ____ / ____ / ____			
Assinale os sintomas presentes desde o início do quadro:			
Coriza	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Obstrução nasal	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Presença de Febre	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI Temp máxima: ____°C
Tosse seca	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Tosse com catarro	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Chiado	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Cansaço ou falta de ar	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Lábios roxos	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Vômitos pós tosse	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Diarréia	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Uso de remédios nos últimos dias?	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Uso de medicações por via inalatória (nos últimos 3 dias): ☐ NÃO ☐ SIM			
☐ Soro Fisiológico			
☐ Berotec			
☐ Atrovent			
☐ Aerolin			
☐ Outros _____			
Outros remédios nos últimos dias? Relacione abaixo:			

Telefones de Contato (assinale a preferência para contato e o melhor período):

☐ Residência _____	☐ Celular _____
☐ Trabalho _____	Período: ☐ manhã ☐ tarde

Você deseja receber o resultado dos exames de pesquisa de vírus?

(este resultado poderá demorar bastante, pois trata-se de uma pesquisa) ☐ SIM ☐ NÃO

Assinatura: _____

ANEXO 4

EXAME FÍSICO: “Etiologia, resposta inflamatória local e impacto clínico das infecções respiratórias virais em lactentes no 1º episódio de sibilância”**DADOS DE EXAME FÍSICO:**

Peso: _____ Kg (p _____)			
Estatura: _____ cm (p _____)			
Temperatura _____ °C			
Estado geral:	☐ Bom	☐ Regular	☐ Ruim
	☐ Tranquilo	☐ Agitado	☐ Prostrado
Exantema:	☐ NÃO	☐ SIM	
Eczema facial:	☐ NÃO	☐ SIM	
Eczema dobras flexurais:	☐ NÃO	☐ SIM	
Eczema retroauricular:	☐ NÃO	☐ SIM	
Conjuntivite?	☐ SIM	☐ NÃO	
Faringe e Amígdala:	☐ Normal	☐ Hiperemia	☐ Exsudato Purulento
	☐ Hipertrofia	☐ Petéquias	☐ Vesículas/Ulcerações
Otoscopia D:	☐ Normal	☐ Hiperemia com brilho	
	☐ Hiperemia sem brilho	☐ Coleção/Abaulamento	
	☐ Opacidade sem hiperemia	☐ Perfuração/Otorréia	
Otoscopia E:	☐ Normal	☐ Hiperemia com brilho	
	☐ Hiperemia sem brilho	☐ Coleção/Abaulamento	
	☐ Opacidade sem hiperemia	☐ Perfuração/Otorréia	
Frequência cardíaca: _____ bpm			
Ausculta cardíaca:	☐ Normal	☐ Alterada	
Descreva: _____			
Abdomen:	☐ Normal	☐ Distendido	☐ Visceromegalia
Descreva: _____			
Frequência respiratória (contar 60 seg.):			

Saturação de O ₂ :			
Cianose?	☐ SIM	☐ NÃO	
Gemência?	☐ SIM	☐ NÃO	
Presença de estridor:	☐ SIM	☐ NÃO	
Deformidade torácica?	☐ NÃO	☐ SIM	
Se SIM:	☐ pectus excavatum	☐ pectus carinatum	☐ outra
Descreva: _____			
Apnéias:	☐ SIM	☐ NÃO	
Tiragens:	☐ Intercostal	☐ Subcostal	☐ Fúrcula ☐ Batimento asa nasal
Sibilos:	☐ SIM	☐ NÃO	
Roncos:	☐ SIM	☐ NÃO	
Estertores finos:	☐ SIM	☐ NÃO	
Se SIM: ☐ Difusos ☐ Localizados			

DADOS DO TRATAMENTO MINISTRADO NA UPA:

Uso de medicações por via inalatória		☐ NÃO	☐ SIM
Número de doses?			
☐ Soro Fisiológico	☐ 1	☐ 2	☐ 3 ☐ >3
☐ Fenoterol	☐ 1	☐ 2	☐ 3 ☐ >3
☐ Fenoterol + Ipratrópio	☐ 1	☐ 2	☐ 3 ☐ >3
☐ Ipratrópio	☐ 1	☐ 2	☐ 3 ☐ >3
☐ Salbutamol	☐ 1	☐ 2	☐ 3 ☐ >3
☐ Outros _____			
Corticosteróide?	☐ NÃO	☐ SIM	☐ VO ☐ IM ☐ IV
Qual? _____		Dose: _____ mg	
Antibiótico?	☐ SIM	☐ NÃO	
Qual? _____			
Fez Rx de tórax?	☐ SIM	☐ NÃO	
Se SIM, marque os achados:		☐ NORMAL	☐ Hiperinsuflação

Bronquiolite viral aguda: etiologia e impacto clínico imediato e tardio em pacientes atendidos em um hospital privado de São Paulo.

☐ Espessamento paredes brônquicas ☐ Opacidades heterogêneas ☐ Opacidade bem delimitada (condensação) ☐ Atelectasia ☐ Outros: descreva _____	
Internação?	☐ SIM ☐ NÃO SE SIM: ☐ Apto ☐ Semi ☐ UTI ☐ Oxigênio suplementar ☐ Ventilação mecânica

Médico: _____

TABLE 1—Instrumento de avaliação da dificuldade respiratória (Escore Máximo=17)

Pontos	0	1	2	3	4	Máximo
Chiado expiratório	Nenhum	final	metade	Três quartos	Toda	4
Chiado inspiratório	Nenhum	Parte	Toda			2
Localização do chiado	Nenhum	Segmentar	Difuso			2
Retrações Intercostais	Nenhuma	Leves	Moderadas	Marcadas		3
Retrações supraclaviculares	Nenhuma	Leves	Moderadas	Marcadas		3
Retrações Subcostais	Nenhuma	Leves	Moderadas	Marcadas		3

1 Segmentar indica <2 de 4 campos pulmonares, and difuso indica >3 of 4 campos pulmonares.

2 Ralston et al.

ANEXO 5

CARTA AO MÉDICO: “Etiologia, resposta inflamatória local e impacto clínico das infecções respiratórias virais em lactentes no 1º episódio de sibilância”

Prezado Dr. _____

O seu paciente _____ foi atendido em consulta na Unidade de Primeiro Atendimento do HIAE no dia ____ / ____ / ____ com seu **primeiro episódio de sibilância**. Após consultar seus familiares (responsáveis), o mesmo foi incluído na pesquisa denominada “BRONQUIOLITE VIRAL AGUDA: ETIOLOGIA E IMPACTO CLÍNICO IMEDIATO E TARDIO EM PACIENTES ATENDIDOS EM UM HOSPITAL PRIVADO DE SÃO PAULO”. Esta pesquisa consiste em coletar uma amostra de lavado nasal da criança e realizar questionários com os pais sobre antecedentes e a história do processo atual. Posteriormente serão realizadas entrevistas telefônicas em 15 e 30 dias, e após 3, 6 e 12 meses do quadro inicial. Estas entrevistas terão o intuito de verificar a evolução da criança no que se refere aos sintomas de atopia e sibilância.

Gostaríamos de reiterar a importância da participação do seu paciente no projeto de pesquisa, e comunicá-lo que estamos à disposição para prestar quaisquer esclarecimentos que se façam necessários neste sentido.

Atenciosamente,

Dr. Luiz Vicente R. Ferreira da Silva Filho
Unidade de Primeiro Atendimento
Clínica de Especialidades Pediátricas
Hospital Israelita Albert Einstein
Tel. 3747-0200 / 3747-2255

ANEXO 6

ENTREVISTA DE 15 E 30 DIAS: “Etiologia, resposta inflamatória local e impacto clínico das infecções respiratórias virais em lactentes no 1º episódio de sibilância”

Quem realizou a entrevista:

NOME: _____

Data: ____ / ____ / ____ Hora: _____

Quem respondeu à entrevista:

NOME: _____

Grau de parentesco: _____

COMO ESTÁ O PACIENTE DESDE O EPISÓDIO DE CHIADO:

A criança está bem?	☐ SIM	☐ NÃO	☐ óbito: data _____
Foi internado?	☐ NÃO ☐ SIM		
Se SIM, aonde? _____	por quantos dias? _____		
Ficou em UTI?	☐ NÃO	☐ SIM	
Precisou de respirador artificial (intubação)?	☐ NÃO	☐ SIM	
Precisou voltar ao Pronto Socorro?	☐ NÃO	☐ SIM	
Quais sintomas persistem?			
Coriza	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Obstrução nasal	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Presença de Febre	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Tosse seca	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Tosse com catarro	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Cansaço ou falta de ar	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Lábios roxos	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Vômitos pós tosse	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Uso de remédios desde o início do episódio?			
☐ NÃO ☐ SIM ☐ NÃO SEI			
Uso de medicações por via inalatória (nos últimos 3 dias): ☐ NÃO ☐ SIM			
☐ Soro Fisiológico			
☐ Berotec			
☐ Atrovent			
☐ Aerolin			
☐ Outros _____			

Bronquiolite viral aguda: etiologia e impacto clínico imediato e tardio em pacientes atendidos em um hospital privado de São Paulo.

Usou remédios como predsim, prelone, prednisolon, decadron, celestamine, celestone?		☐ SIM	☐ NÃO
Usou algum antibiótico?	☐ SIM	☐ NÃO	
Qual? _____	☐ NÃO SEI		
Está usando algum tipo de "bombinha" ou spray?		☐ SIM	☐ NÃO
Se SIM, qual:	☐ Aerolin	☐ Berotec	☐ Duovent
	☐ Serevent	☐ Busonid	☐ Beclosol
	☐ Flixotide	☐ Seretide	☐ Clenyl
Usou algum destes remédios?	☐ Singulair	☐ Pulmicort	☐ Clenyl compositum
	☐ Zaditen	☐ Outro: _____	
Outros remédios nos últimos dias? Relacione abaixo:			
Fez fisioterapia respiratória?	☐ SIM	☐ NÃO	

Qual é sua opinião quanto à participação de seu filho na pesquisa?

☐ Gostei ☐ Não gostei

Se não, porque? _____

O senhor(a) está ciente que outras entrevistas serão necessárias?

(dentro de 15 dias e outras aos 3, 6 e 12 meses do episódio inicial)

☐ Sim ☐ Não

O senhor(a) concorda em responder outras entrevistas?

☐ Sim ☐ Não

Telefones de Contato (assinale a preferência para contato e o melhor período):

☐ Residência _____
☐ Celular _____
☐ Trabalho _____
☐ manhã ☐ tarde

ANEXO 7

ENTREVISTA DE 3, 6 E 12 MESES: “Etiologia, resposta inflamatória local e impacto clínico das infecções respiratórias virais em lactentes no 1º episódio de sibilância”

Quem realizou a entrevista:

NOME: _____

Data: ____ / ____ / ____ Hora: _____

Quem respondeu à entrevista:

NOME: _____

Grau de parentesco: _____

COMO ESTÁ O PACIENTE DESDE A ÚLTIMA ENTREVISTA:

A criança está bem?	☐ SIM	☐ NÃO	☐ óbito: data _____
Vocês continuam morando no mesmo local?	☐ SIM	☐ NÃO	
A criança iniciou escola/berçário?	☐ NÃO	☐ SIM	
Quando? ____ / ____ (mês/ano)	☐ ½ período	☐ período integral	
Vocês adquiriram algum animal?	☐ NÃO	☐ CÃO quantos: _____	☐ GATO quantos: _____
O chiado persiste ?	☐ NÃO	☐ SIM	
	Se SIM	☐ contínuo	☐ vai e volta
Se o chiado Vai e Volta:	☐ >1x/semana	☐ 1x/semana	☐ 1x/15 dias ☐ 1x/mês
É chiado ou ronqueira?	☐ Chiado	☐ Ronqueira	☐ NÃO SEI
O que desencadeia o chiado?	☐ Infecção respiratória	☐ Mudança de tempo	
	☐ Cheiros fortes	☐ Fumaça de cigarro	☐ NÃO SEI
Seu filho tem tosse durante o dia?	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
A tosse é:	☐ seca	☐ com catarro	
Frequência da tosse:	☐ >1x/semana	☐ 1x/semana	☐ 1x/15 dias ☐ 1x/mês
Seu filho tem tosse noturna?	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
A tosse é:	☐ seca	☐ com catarro	
Frequência da tosse:	☐ >1x/semana	☐ 1x/semana	☐ 1x/15 dias ☐ 1x/mês
Seu filho tem tosse, chiado ou falta de ar com exercício físico ou agitação (excitação, risada)?	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Precisou voltar ao Pronto Socorro?	☐ NÃO	☐ SIM	

Quantas vezes por causa de chiado/tosse?		☐ 1	☐ 2	☐ 3	☐ mais de 3
Foi internado?		☐ NÃO		☐ SIM n° de vezes ____	
Se SIM, aonde? _____		por quantos dias (total)? _____			
Ficou em UTI?		☐ NÃO		☐ SIM	
Precisou de respirador artificial (intubação)?		☐ NÃO		☐ SIM	
Quais outros sintomas vem apresentando?					
Coriza	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI		
Espirros frequentes	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI		
Coceira no nariz	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI		
Obstrução nasal	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI		
Cansaço ou falta de ar	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI		
Alergia na pele	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI		
	☐ atrás da orelha	☐ dobras braços/pernas	☐ bochechas		
Relacionada a picada de inseto?		☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI	
Uso de remédios desde a última entrevista?					
		☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI	
Uso de medicações por via inalatória:					
		☐ NÃO	☐ SIM		
☐ Soro Fisiológico					
☐ Berotec					
☐ Atrovent					
☐ Aerolin					
☐ Outros _____					
Usou remédios como predsim, prelone, prednisolon, decadron, celestamine, celestone?					
		☐ SIM		☐ NÃO	
Teve alguma otite (infecção do ouvido)?					
		☐ NÃO	☐ SIM	N° de vezes: ____	
Teve alguma pneumonia?					
		☐ NÃO	☐ SIM	N° de vezes: ____	
Usou algum antibiótico?					
		☐ NÃO	☐ SIM	N° de vezes: ____	
Qual(is)? _____				☐ NÃO SEI	
Está usando algum tipo de "bombinha" ou spray?					
		☐ SIM		☐ NÃO	
Se SIM, qual:					
☐ Aerolin	☐ Berotec	☐ Duovent	☐ Flixotide	☐ Seretide	
☐ Serevent	☐ Busonid	☐ Beclosol	☐ Clenyl		
Usou algum destes remédios?					
☐ Singulair	☐ Pulmicort	☐ Clenyl compositum			
☐ Zaditen	☐ Outro: _____				
Outros remédios nos últimos dias? Relacione abaixo:					

<p>Desde a última entrevista (nos últimos 2 meses), quantos dias de trabalho você perdeu por causa de problemas respiratórios do seu filho(a)?</p> <p>☐ nenhum ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ >5</p>
<p>Desde a última entrevista (nos últimos 2 meses), quantos dias de berçário/escola seu filho(a) perdeu por causa de problemas respiratórios?</p> <p>☐ nenhum ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ >5</p>
<p>Houve alguma mudança na alimentação de seu filho(a) por conta dos problemas respiratórios?</p> <p>☐ Não ☐ Sim Qual? _____</p>
<p>Seu filho(a) foi submetido a algum tratamentos alternativo por conta dos problemas respiratórios?</p> <p>☐ Não ☐ Sim Qual? _____</p>
<p>Seu filho(a) recebeu a vacina pneumocócica (Prevenar ou Pneumo23)?</p> <p>☐ Não ☐ Sim</p>

Qual é sua opinião quanto à participação de seu filho na pesquisa?

☐ Gostei ☐ Não gostei

Se não, porque?

O senhor(a) concordaria em responder outras entrevistas?

☐ Sim ☐ Não

Telefones de Contato (assinale a preferência para contato e o melhor período):

☐ Residência _____

☐ Celular _____

☐ Trabalho _____

☐ manhã ☐ tarde