Marina Buarque de Almeida

Avaliação das infecções respiratórias virais em pacientes com fibrose cística

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor 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

Almeida, Marina Buarque de

Avaliação das infecções respiratórias virais em pacientes com fibrose cística /
Marina Buarque de Almeida. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--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.Fibrose cística 2.Biologia Molecular 3.Rhinovirus 4.Vírus
sincicial respiratório 5.Vírus da Influenza 6.Bocavirus humano 7.Infecções por
paramyxoviridae 8.Metapneumovirus

USP/FM/SBD-024/10

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e sigla

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Considerações Gerais.....	02
1.2 Genética e Incidência da FC.....	02
1.3 Importância da Infecção Bacteriana na FC.....	03
1.4 Infecções Virais na FC.....	04
1.4.1 Prevalência das Infecções Virais.....	04
1.4.2 Repercussões das Infecções Virais na FC.....	04
1.5 Diagnóstico da Infecção Viral.....	06
1.6 Justificativa.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivos Gerais.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15

3 MÉTODOS.....	16
3.1 Casuística.....	17
3.2 Métodos.....	17
3.2.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	18
3.2.2 Delineamento do estudo.....	18
3.2.3 Protocolo clínico (Coleta de dados).....	18
3.2.3.1 Oximetria de pulso.....	19
3.2.3.2 Testes de função pulmonar.....	19
3.2.3.3 Coleta de amostras clínicas.....	20
3.2.3.3.1 Amostras de sangue.....	20
3.2.3.3.2 Coleta de escarro ou esfregaço de orofaringe.....	21
3.2.3.3.3 Coleta de lavado nasal.....	21
3.3 Diagnóstico de infecções bacterianas.....	23
3.4 Diagnóstico das infecções virais.....	23
3.4.1 Processamento inicial das amostras.....	23
3.4.2 Técnica de imunofluorescência.....	24
3.4.3 Métodos de biologia molecular.....	26
3.4.3.1 Extração de DNA e RNS das amostras clínicas.....	26
3.4.3.2 Síntese de cDNA (RT-PCR).....	26
3.4.3.3 Reação da cadeia de polimerase (PCR).....	26
3.4.3.4 Escolha das sondas iniciadoras (<i>primers</i>).....	26
3.4.3.5 Métodos de PCR e RT-PCR em uma placa.....	29
3.4.3.6 Controles para todas as etapas do método.....	30
3.4.3.7 Revelação dos produtos no seqüenciador automatizado.....	31
3.4.3.8 Diagnóstico das infecções por rinovírus e enterovírus.....	33
3.4.3.9 Sequenciamento de amplicómeros para verificação de discrepâncias e confirmação de identidade.....	35
3.5 Controle de coletas e registro de dados.....	36
3.6 Análise estatística.....	36
 4 RESULTADOS.....	 37
4.1 Coletas e avaliações clínicas.....	38
4.1.1 Dados demográficos.....	38
4.1.2 Tipo de consulta, tipo de coleta e situação clínica.....	39

4.1.3 Avaliação funcional.....	41
4.1.4 Sintomas por ocasião da coleta.....	42
4.2 Resultados de culturas.....	43
4.3 Resultados de virologia.....	45
4.3.1 Imunofluorescência indireta.....	45
4.3.2 Métodos moleculares.....	45
4.3.2.1 Infecções virais e idade.....	48
4.3.2.2 Infecções virais e sazonalidade.....	50
4.3.2.3 Persistência viral.....	54
4.3.3 Impacto clínico das infecções virais.....	54
4.3.4 Infecções virais e principais desfechos.....	54
4.3.4.1 Infecções por rinovírus e principais desfechos.....	55
4.3.4.2 Infecções por outros vírus e principais desfechos.....	57
 5 DISCUSSÃO.....	 58
 6 CONCLUSÕES.....	 70
 7 ANEXOS.....	 72
 8 REFERÊNCIAS.....	 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Adeno	Adenovírus
Flu A	Vírus influenza A
Flu B	Vírus influenza B
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CVF	Capacidade vital forçada
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EEG	Equação de estimação generalizadas
FC	Fibrose cística
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
ICr	Instituto da Criança
IMTSP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
NASBA	<i>Nucleic acid sequence based amplification</i>
OR	<i>odds ratio</i>

pb	pares de bases
PCR	reação da cadeia de polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIV	vírus parainfluenza
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	PCR em tempo real (<i>real time PCR</i>)
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
URF	Unidades relativas de fluorescência
USP	Universidade de São Paulo
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VEF1/CVF	Índice de Tiffeneau
VSR	Vírus sincicial respiratório

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxo de consultas, avaliações funcionais e coletas dos pacientes durante o estudo.....	022
Figura 2 - Representação esquemática da preparação das placas para reação da cadeia de polimerase para identificação de 11 vírus respiratórios.....	029
Figura 3 - Representação do plasmídeo contendo todas as seqüências alvo.....	031
Figura 4 - Pool formado a partir de uma linha da placa para corrida eletroforética capilar em seqüenciador de DNA.....	032
Figura 5 - Imagem dos resultados de uma amostra de amplificação de controle positivo no Software FragmentAnalysis (GE Healthcare)-picos das diferentes amplificações.....	033
Figura 6 - Distribuição do número de pacientes por idade da população estudada.....	039
Figura 7 - Diagnóstico de exacerbação respiratória em relação ao tipo de consulta.....	040
Figura 8 - Distribuição do total de vírus identificados.....	047
Figura 9 - Box-plot da distribuição de idade dos grupos vírus negativo e vírus positivo, representando intervalos interquartis, mediana e limites máximo e mínimo das idades representados pelas linhas externas ao quadro.....	049
Figura 10 - Box-plot da distribuição de idade dos grupos VSR negativo e VSR positivo, representando intervalos interquartis, mediana e limites máximo e mínimo das idades representados pelas linhas externas ao quadro.....	049

Figura 11 - Box-plot da distribuição de idade dos grupos entero negativo e entero positivo, representando intervalos interquartis, mediana e limites máximo e mínimo das idades representados pelas linhas externas ao quadro.....	050
Figura 12 - Distribuição da coleta de amostras e positividade (identificação de pelo menos um vírus) ao longo do Período do estudo.....	051
Figura 13 - Distribuição sazonal do rinovírus ao longo do estudo.....	051
Figura 14 - Distribuição sazonal do enterovírus ao longo do estudo.....	052
Figura 15 - Distribuição sazonal do bocavírus ao longo do estudo.....	052
Figura 16 - Distribuição sazonal do coronavírus ao longo do estudo.....	053
Figura 17 - Distribuição sazonal do VSR ao longo do estudo.....	053
Figura 18 - Distribuição dos subtipos de rinovírus identificados.....	056

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos e características gerais dos pacientes.....	039
Tabela 2 – Situação funcional dos pacientes avaliada por espirometria.....	041
Tabela 3 - Saturação arterial de oxigênio medida por oximetria de pulso.....	042
Tabela 4 - Sintomas dos últimos cinco dias relatados no questionário clínico	042
Tabela 5 - prevalência de sinais e/ou sintomas utilizados na definição de exacerbação da doença respiratória.....	043
Tabela 6 - Distribuição das bactérias identificadas nas culturas bacterianas das amostras.....	404 044
Tabela 7 - Vírus respiratórios identificados em amostras de nasofaringe de pacientes portadores de fibrose cística.....	046
Tabela 8 - Co-infecções virais identificadas em 26 amostras de nasofaringe de pacientes portadores de fibrose cística.....	048
Tabela 9 - Associação entre os sintomas relatados nos cinco dias precedendo a consulta e identificação viral.....	055
Tabela 10 - Associação entre o diagnóstico de exacerbação da doença respiratória e a identificação de rinovírus e os subtipos de rinovírus nas amostras de nasofaringe.....	056
Tabela 11 - Associação entre o diagnóstico de exacerbação da doença respiratória e a identificação de vírus nas amostras de nasofaringe.....	057

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequência de <i>primers</i> escolhidos para a identificação dos vírus respiratórios.....	028
--	-----

RESUMO

Almeida, MB. Avaliação das infecções respiratórias virais em pacientes com fibrose cística [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto clínico, funcional e bacteriológico das infecções respiratórias virais nos pacientes com fibrose cística durante um ano. A identificação viral foi feita por métodos de biologia molecular para os seguintes vírus: Vírus sincicial respiratório, Influenza A e B, Parainfluenza 1, 2 e 3, Adenovírus, Rinovírus, Metapneumovírus humano, Coronavírus, Enterovírus e Bocavírus. Foram 408 amostras com identificação viral em 199 amostras (48,7%). O Rinovírus foi o mais prevalente sendo identificado em 140 amostras (34,31%), mas contrastando com outros estudos em fibrose cística e em outras doenças pulmonares crônicas, o Rinovírus não mostrou ter impacto clínico, funcional ou bacteriológico significativo nos pacientes com fibrose cística.

Descritores: Fibrose cística; Biologia Molecular; Rhinovirus; Vírus sincicial respiratório; Vírus da Influenza; Bocavirus humano; Infecções por paramyxoviridae; Metapneumovirus.

SUMMARY

Almeida, MB. Respiratory viral infections evaluation in cystic fibrosis patients [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

The objective of this study was to evaluate the clinical, functional and bacteriological impact of the viral respiratory tract infections in cystic fibrosis patients over one year. Viral identification was done through molecular biology methods for the following virus: Respiratory syncytial virus, Influenza A and B, Parainfluenza viruses type 1 to 3, Adenovirus, Rhinovirus, Human metapneumovirus, Coronavirus, Enterovirus and Human bocavirus. 199 (48,7%) samplings among 408 were positive for at least one virus. Rhinovirus was the virus with a higher prevalence, which was identified in 140 samplings (34,31%), but without clinical, functional or bacteriological impact contrasting with other studies in patients with cystic fibrosis and other chronic lung diseases.

Descriptors: Cystic fibrosis; Molecular Biology; Rhinovirus; Respiratory syncytial virus; Influenza virus; Human bocavirus; Paramyxoviridae infections; Metapneumovirus.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos três meninos, “ma petite famille”, muito obrigada por toda compreensão e paciência durante a realização desta tese. Pedro e André, vocês são filhos adoráveis!

Paulo, meu amor e pai exemplar. Obrigada!

A toda minha família, que funcionou como uma grande rede de apoio e em momentos de dificuldade sempre souberam me amparar! Eduardo, Beth, Heloisa, Flávia e Guto, vocês sempre serão para mim a melhor família “telerim”!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Luiz Vicente Ferreira da Silva Filho, por toda confiança em mim depositada nos últimos anos. Professor de extrema competência, a quem admiro enormemente por sua competência científica. Obrigada pela sua amizade!

Ao Dr. Joaquim Carlos Rodrigues, professor que me orientou no meu mestrado e foi responsável pela minha inauguração e minha permanência na vida acadêmica.

À Dra. Fabíola Villac Adde, por todo carinho e amizade nos últimos 12 anos e incentivo constante para meu aprimoramento.

Às Dras. Cleyde M. A. Nakaie e Dra. Joselina M. Cardieri, professoras experientes, a quem devo muito do meu aprendizado.

Agradeço aos colegas mais novatos da Unidade, meus companheiros de insistência: Claudine, Fábio, Sylvinha, Flávia e... Simone (além mares).

A todos colegas desta grande família chamada Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança, por conseguirem manter-se coesos e éticos. Muito obrigada por me considerarem parte desta família!

Agradeço a fisioterapeuta Thelma R. Flores que de forma impecável executou o trabalho árduo e braçal da fase de coletas deste pesquisa.

Às professoras Dra. Sônia Regina T. Ramos, Dra. Maria Zilda de Aquino e Dra. Fabíola Villac Adde pela ajuda e sugestões durante a qualificação.

Agradeço à Mariza Kazue U. Yoshikawa bibliotecária do Instituto da Criança, HCFMUSP pela constante amabilidade e ajuda durante os últimos 3 anos.

A todos amigos e familiares (a lista é grande) que puderam ajudar das mais variadas formas, no entretenimento dos meninos ou até mesmo no trabalho mais braçal, muito obrigada!

Agradeço à FAPESP pelo financiamento para que este estudo pudesse ser executado.

Agradeço à CAPES pelo auxílio com bolsa de estudo durante a pós-graduação.

Em especial, agradeço aos pacientes com Fibrose cística e seus familiares que gentilmente concordaram em fazer parte desta pesquisa.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A fibrose cística (FC) é a doença de herança autossômica recessiva mais letal nos caucasianos. A doença tem envolvimento multissistêmico (sistema respiratório, gastrointestinal, hepático e genitourinário), mas em cerca de 85% dos casos a letalidade está relacionada ao dano pulmonar¹. Atualmente a mediana de sobrevida destes pacientes nos Estados Unidos está ao redor de 37 anos de vida, onde 45% deles atingem a idade adulta². Em 1980 a mediana de sobrevida era ao redor de 18 anos de vida. O aumento desta expectativa de vida se deve a uma série de fatores como diagnóstico precoce, ressaltando aqui a importância e o impacto do teste de triagem neonatal realizado em alguns serviços, a abordagem nutricional mais agressiva e preventiva, assim como uma abordagem mais agressiva das infecções pulmonares tanto na prevenção como no tratamento³⁻¹⁰.

1.2 GENÉTICA E INCIDÊNCIA DA FC

O gene da FC¹¹⁻¹³ localiza-se no braço longo do cromossomo 7, chama-se gene CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), é responsável pelo defeito genético básico, que codifica uma proteína com o mesmo nome, CFTR. Esta proteína é um polipeptídeo de 1480 aminoácidos com peso molecular de 168kDa e funciona como um canal de cloro AMPcíclico dependente, que tem como principal função o transporte de íons cloro na superfície apical das células epiteliais¹⁴. No Brasil um estudo recente de Raskin et al.¹⁵ avaliou a

freqüência da homozigose para a mutação mais comum ($\Delta F508$) em cinco Estados brasileiros e estimou a incidência da doença nos brasileiros europeus descendentes em um para 7576 nascidos vivos. Entretanto a variabilidade entre os estados é muito grande, possivelmente decorrente das migrações e miscigenações, calculando-se que possa haver diferenças entre as regiões de até quase 20 vezes.

1.3. IMPORTÂNCIA DA INFECÇÃO BACTERIANA NA FC

Os pulmões são normais ao nascimento, mas a tosse e o acúmulo de secreção pulmonar podem ocorrer precocemente, habitualmente desencadeados por uma infecção viral¹⁶. O dano pulmonar é precoce, ocorrendo inflamação¹⁷⁻¹⁸ e prejuízo com disfunção do transporte mucociliar, com conseqüente aquisição de bactérias que colonizam cronicamente as vias aéreas¹⁹. A colonização do trato respiratório por patógenos peculiares como o *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, complexo *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia* intensificam o processo inflamatório na árvore traqueobrônquica dos pacientes²⁰ e determinarão uma intensa inflamação neutrofílica crônica das vias aéreas. A infecção crônica pela *P. aeruginosa* é associada ao aumento da morbiletalidade dos pacientes com FC²¹⁻²². Com a evolução da doença ocorre um declínio progressivo da função pulmonar em consequência dos episódios de agudização ou exacerbação pulmonar, que se caracterizam por eventos agudos de intensificação dos sintomas respiratórios²³⁻². O processo infeccioso e inflamatório crônico acaba por levar à formação de bronquiectasias e destruição da arquitetura pulmonar, culminando com insuficiência respiratória crônica, *cor pulmonale* e óbito.

1.4 INFECÇÕES VIRAIS NA FC

1.4.1 PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES VIRAIS

A prevalência de infecções respiratórias virais em pacientes pediátricos com FC é muito variável, de 13% a 52%, e mais alta nos grupos mais jovens²⁵⁻²⁶. Já em adultos com FC, Clifton et al.²⁷ relataram incidência anual de infecções virais de 4,9%, utilizando a sorologia como método diagnóstico, mostrando que nesta faixa etária os vírus tem menor prevalência e são de menor relevância clínica. Esta grande variabilidade nos resultados dos diversos estudos, resulta em parte da falta de uma adequada padronização dos métodos diagnósticos, especialmente nos estudos mais antigos, sendo que os estudos mais recentes tendem a encontrar maiores taxas de detecção viral provavelmente por usarem métodos de diagnóstico mais efetivos, especialmente quando emprega-se métodos de biologia molecular com pesquisa direcionada para um painel com maior número de vírus.

Alguns estudos mostram não haver diferenças na prevalência de infecções de vias aéreas superiores ou mesmo infecções respiratórias virais comprovadas entre pacientes com FC e controles, apesar de se observar a ocorrência de sintomas de vias aéreas inferiores com mais frequência nos pacientes com FC²⁸⁻³⁰.

1.4.2 REPERCUSSÕES DAS INFECÇÕES VIRAIS NA FC

As infecções por vírus respiratórios podem resultar em grandes danos ao epitélio respiratório de indivíduos normais, especialmente quando o agente é o vírus sincicial respiratório (VSR), adenovírus ou influenza³¹. Apesar do vasto conhecimento relacionado à importância das infecções bacterianas na evolução da doença pulmonar dos pacientes com FC, pouco se conhece sobre o impacto das

infecções virais e suas repercussões microbiológicas, funcionais e no prognóstico destes pacientes. Sabe-se que as exacerbações respiratórias destes pacientes freqüentemente não são acompanhadas de febre ou neutrofilia significativa, sugerindo a possibilidade de envolvimento viral nestes episódios³². Existem algumas evidências na literatura de que as infecções por vírus respiratórios podem determinar exacerbações pulmonares e progressão da doença pulmonar na FC^{26, 33-34}. Ramsey et al.²⁸ e Hiatt et al.²⁹ avaliaram de forma prospectiva a ocorrência de infecções virais em pacientes com FC em cerca de 20 pacientes cada, por um período de dois a três anos, mostrando maior ocorrência de sintomas de vias aéreas inferiores e repercussão funcional entre os pacientes com fibrose cística acometidos por infecções virais, quando comparados aos controles.

Nos lactentes com FC as infecções virais repercutem com aumento da taxa de hospitalização³⁵. Estas infecções virais causam anormalidades funcionais respiratórias e progressão da doença³⁶. A prevenção e um adequado conhecimento destas infecções virais poderiam postergar a perda da função pulmonar e reduzir o risco da colonização precoce por *P. aeruginosa*³².

O papel das infecções virais em outras doenças pulmonares crônicas como na asma³⁷⁻⁴¹ e na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)^{40, 42-43} já está bem estabelecido. Poderíamos imaginar então que assim como nestes estudos, as infecções respiratórias virais nos pacientes com FC poderiam acarretar exacerbações pulmonares e determinar piora clínica e funcional.

Os pacientes com FC não parecem ter maior incidência de infecções respiratórias virais, mas elas parecem determinar maior impacto clínico-funcional que em grupos de controle^{29-30, 44-45}. Alguns fatores locais dos pacientes com FC poderiam explicar porque neles ocorre uma maior replicação viral, com conseqüente

maior produção de citocinas, justificando a maior gravidade destas infecções virais neste grupo de doentes⁴⁵. Colasurdo et al.⁴⁶ demonstraram que ratos com FC têm uma resposta inflamatória exagerada porém uma inabilidade em eliminar o VSR. Acredita-se então que esta replicação viral exacerbada e resposta inflamatória exagerada causem um dano local ainda maior nas vias aéreas³⁰.

1.5 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO VIRAL

Os estudos iniciais de infecções respiratórias virais em pacientes com FC foram baseados em sorologias com amostras pareadas, isolamento viral ou imunofluorescência^{28, 47}. Um dos primeiros estudos na área foi publicado em 1984, relatando seguimento de 49 pacientes por 2 anos e identificação viral através de sorologia e lavado nasal para isolamento viral em cultura. Utilizando os irmãos não fibrocísticos como controles, o autor não observou prevalência diferente de identificações virais entre o grupo de pacientes com FC e os controles, apesar dos primeiros apresentarem doenças respiratórias com maior frequência. Os indivíduos com infecção viral comprovada apresentaram piora dos parâmetros de função pulmonar e maior frequência e duração de hospitalizações⁴⁷.

Segundo alguns autores muitos dos estudos realizados podem ter subestimado a importância dos processos infecciosos virais neste grupo de doentes devido aos seguintes fatores³²: 1. baixa taxa de detecção viral nas culturas teciduais ou pelas técnicas de imunofluorescência³⁰; 2. uso de critérios subjetivos para determinar exacerbações respiratórias, faltando dados objetivos como função pulmonar²³; 3. dificuldade técnica em isolar vírus na secreção espessa dos pacientes com FC, podendo diminuir a sensibilidade dos métodos utilizados⁴⁸ e; 4. a

indisponibilidade de métodos moleculares para investigação etiológica na maioria dos estudos relatados³². Este fato pode ser constatado no estudo de Ramsey²⁸, onde a identificação viral foi feita por métodos sorológicos, o que deve ter acarretado uma baixa taxa de infecção viral podendo justificar o inesperado resultado encontrado, onde o grupo com infecção viral teve menor taxa de declínio funcional respiratório e menor gravidade de escore clínico. De forma oposta outra pesquisa mostra que as infecções virais respiratórias agudas se associaram a maior impacto clínico-funcional e a necessidade de hospitalização por exacerbação pulmonar⁴⁹. Neste caso foram usados dois métodos para identificação viral (cultura e sorologia), o que pode ter ajudado numa maior taxa de identificação viral.

Outra questão importante a ser respondida diz respeito à diferença de gravidade conforme o vírus em questão, já que é bem conhecido na literatura que determinados vírus como o rinovírus e o influenza tem maior impacto no grupo de pacientes asmáticos. Um estudo realizado em 1990 por Pribble et al.⁵⁰, mostra que as exacerbações agudas respiratórias em pacientes com FC foram de gravidade maior quando se identificou o vírus influenza. Estes autores concluem então que a prevenção contra influenza deve ser realizada nos pacientes com FC. Em lactentes o VSR determina exacerbações respiratórias com hospitalizações mais prolongadas, maior morbidade respiratória, maior risco de necessidade de suporte ventilatório e maior taxa de oxigenoterapia domiciliar após a alta³⁵, mostrando o impacto da infecção viral também a longo prazo.

Os vírus respiratórios que aparentemente causam um maior dano na função pulmonar de pacientes com FC são o VSR e Influenza, sendo o primeiro mais importante para os lactentes, hospitalizados com maior frequência durante a estação de VSR (outono e inverno)^{29, 35, 51-52}.

Nos últimos quatro anos foram publicados três estudos usando métodos de biologia molecular para identificação de vírus respiratórios em pacientes com FC^{30, 51, 53}. O estudo de Olesen et al.⁵³, publicado no final do ano de 2006 pesquisou sete diferentes vírus respiratórios e bactérias atípicas em pacientes ambulatoriais com FC, utilizando os métodos de PCR e RT-PCR em tempo real. Foram incluídos 75 pacientes, todos menores que 16 anos, e nas amostras colhidas entre fevereiro de 2002 e janeiro de 2003 foram pesquisados influenza A e B, parainfluenza 3, adenovírus, VSR, rinovírus e metapneumovírus humano. Das 606 amostras coletadas, 96 amostras de 45 pacientes tiveram algum agente viral identificado. Uma única amostra teve co-infecção por rinovírus e influenza A. Oito pacientes tiveram duas amostras positivas para rinovírus com intervalo de quatro a seis semanas entre as coletas. O rinovírus foi o mais prevalente e não influenciou na função pulmonar. Não houve mudança no perfil de colonização bacteriana durante ou após as infecções virais e os sintomas clínicos não se correlacionaram com o diagnóstico de infecção viral.

O estudo de Wat et al.⁵¹ investigou nove diferentes vírus respiratórios durante 17 meses, entre dezembro de 2002 a maio de 2004 no Reino Unido, em pacientes abaixo de 18 anos provenientes de quatro Centros distintos. Foram colhidos materiais para análise nas consultas de rotina ou durante as exacerbações respiratórias. O painel de vírus pesquisados através da metodologia NASBA foi: influenza A, influenza B, vírus sincicial respiratório (VSR), parainfluenza 1, 2, 3 e 4, rinovírus e coronavírus. A pesquisa incluiu 71 dos 151 pacientes atendidos nestes quatro Centros. Algum vírus respiratório foi identificado em 63 das 138 amostras (46%); em seis casos (4,3%) houve co-infecção por dois vírus e em três casos (2,2%) três vírus foram identificados na mesma amostra. Influenza A, influenza B,

PIV 4 e rinovírus foram os mais freqüentes. A identificação de algum vírus respiratório foi significativamente mais freqüente nas exacerbações que nas consultas de rotina, sendo influenza A, influenza B e rinovírus os mais freqüentes. Este estudo não mostrou mudança no perfil bacteriológico dos pacientes durante as infecções virais. Houve maior proporção de pacientes no grupo com identificação viral com sintomas de vias aéreas superiores durante as exacerbações.

Já no final de 2008 foi publicado o estudo com maior painel de vírus pesquisados por PCR, totalizando 11 vírus, que foram os seguintes: Rinovírus, Enterovírus, Coronavírus 229E, OC43 e NL63, Metapneumovírus humano, vírus sincicial respiratório A e B, Influenza A e B e adenovírus. Foi um estudo longitudinal por seis meses, de novembro a maio, durante pico de sazonalidade dos vírus. Foram incluídas 20 crianças com FC de até sete anos e 18 controles pareados onde cada criança forneceu em média 16 amostras para as pesquisas virais. As amostras de *swab* nasal para pesquisa viral eram coletadas a cada duas semanas ou na vigência de sintomas de infecção das vias aéreas. Os pacientes com FC apresentaram maior gravidade e maior duração dos sintomas de vias aéreas inferiores após as infecções virais. Foram descritas também maiores quedas nas oximetrias de pulso no grupo com FC. Os vírus mais prevalentes foram Rinovírus, Enterovírus e Coronavírus. Assim como já relatado por outros autores, a taxa de infecção de vias aéreas superiores foi semelhante nos dois grupos³⁰.

Os métodos moleculares representam o novo “padrão” para o diagnóstico de infecções respiratórias virais existindo evidências de sensibilidade e especificidade ao redor de 100%, quando comparados aos métodos de cultura em tecido ou detecção de antígenos virais com anticorpos monoclonais⁵⁴. Na comparação com a cultura em tecidos, os métodos moleculares apresentam sensibilidade superior em

até 30%⁵⁴⁻⁵⁶. Além disso alguns vírus respiratórios de grande relevância clínica só podem ser satisfatoriamente identificados através de métodos moleculares, como o rinovírus, o coronavírus e o metapneumovírus humano.

Nos últimos anos os métodos moleculares vêm sendo progressivamente aprimorados no sentido de redução de tempo e custo para o diagnóstico, além de melhora na sensibilidade para detecção dos vírus. Existem atualmente *kits* comerciais de multiplex PCR para identificação de até sete vírus através de PCR ou PCR em tempo real (Prodesse®), resultando num custo e trabalho significativamente menores que as reações de PCR independentes para cada um dos vírus respiratórios⁵⁷. O método de PCR em tempo real, bastante interessante por minimizar tempo de processamento e risco de contaminação, apresenta como grande desvantagem o alto custo dos reagentes e a impossibilidade de detectar mais de quatro agentes ao mesmo tempo. Outro método bastante promissor é a eletroforese automatizada em capilar, que pode ser utilizada para detecção de produtos de PCR ou multiplex PCR em um seqüenciador de DNA equipado com um *software* de análise de polimorfismo de fragmentos. Trata-se de uma técnica de identificação dos produtos de PCR através da detecção automatizada de fluorescência durante eletroforese em capilar, empregada em procedimentos que requerem grande precisão na determinação do tamanho e quantidade dos fragmentos, como análise de microsatélites, seleção e validação e SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), análise de polimorfismos, entre outros. Em 2003 esta técnica já foi utilizada com sucesso em combinação com RT-PCR para identificação de seis vírus respiratórios por Erdman et al.⁵⁸ e mais recentemente para identificação de nove vírus respiratórios (VSR, influenza A e B, parainfluenza 1, 2 e 3, metapneumovírus, adenovírus e picornavírus) por Thomazelli⁵⁹⁻⁶⁰. Este último

autor comparou o método de RT-PCR, com eletroforese capilar analisada pelo *software* GeneScan[®], à cultura e imunofluorescência para identificação viral em 336 amostras clínicas, observando um grande incremento de sensibilidade com a utilização do método molecular (redução do percentual de amostras negativas de 69% para 22%).

A grande vantagem do método de eletroforese capilar em seqüenciador automatizado é a possibilidade de se realizarem as reações de PCR/RT-PCR com *primers* marcados com fluorescência em uma placa e, posteriormente, analisar um *pool* dos produtos de todas as reações, numa única corrida no seqüenciador em que se acrescenta um marcador de peso molecular. Deste modo, este tipo de abordagem permite o diagnóstico de infecções respiratórias virais em larga escala, viabilizando a detecção de um grande número de vírus com redução de custos e mão de obra. Além disso, a sensibilidade para detecção dos amplímeros é bastante superior à observada na detecção com gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta⁵⁸.

Um terceiro ponto a ser questionado, mas não de menor relevância, diz respeito às interações entre infecções virais e bacterianas, uma vez que muitos estudos sugerem que alguns vírus possam mediar e facilitar a adesão bacteriana ao epitélio respiratório. A lesão do epitélio respiratório após infecção viral pode determinar aumento da aderência de bactérias como *S. aureus*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *P. aeruginosa* mesmo em indivíduos normais⁶¹. A primo-colonização por *Pseudomonas aeruginosa* acontece em 85% das vezes nas três semanas seguintes após uma infecção viral respiratória³⁴.

As infecções virais destroem a barreira epitelial com perda dos cílios e lesão das células epiteliais. Isto aumenta a permeabilidade e exposição da membrana

basal, facilitando aderência bacteriana no epitélio respiratório dos pacientes com FC *in vitro*⁶²⁻⁶³. Há um prejuízo da defesa antibacteriana após infecção viral respiratória por VSR, fato que foi demonstrado por Stark et al.⁶⁴ e uma resposta antibacteriana inadequada dos macrófagos alveolares após exposição ao rinovírus que foi descrita por Oliver et al.⁶⁵.

Em FC a associação entre infecção viral e colonização bacteriana foi relatada num estudo publicado há quase 30 anos, onde os autores mostram que a distribuição da sazonalidade do VSR foi semelhante a aquisição de *Pseudomonas aeruginosa*²⁵. Outros estudos mostram que as infecções respiratórias virais podem predispor à infecção pela *P. aeruginosa*^{26, 63, 66}. Recentemente dois estudos *in vitro* mostraram que a infecção pelo vírus sincicial respiratório aumenta a adesão⁽⁶³⁾ e a colonização crônica⁶⁷ por *Pseudomonas aeruginosa* ao epitélio previamente infectado pelo VSR. A hipótese é de que as infecções virais podem facilitar a aquisição de novas bactérias, mas esta associação não esteve presente nos estudos de Olesen et al.⁵¹ e Wat et al.⁵³

1.6 JUSTIFICATIVA

A Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança é um dos Centros nacionais de referência para tratamento de pacientes com FC. Tem atuado na investigação diagnóstica e epidemiológica de infecções respiratórias com emprego de recursos de biologia molecular nos últimos anos⁶⁸⁻⁷¹, com a participação do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical. A investigação de infecções virais neste grupo de pacientes é uma perspectiva de grande potencial, já que pouco se conhece sobre prevalência e impacto clínico dos vírus respiratórios

nos pacientes com FC no Brasil e mesmo no exterior, especialmente os vírus dependentes de métodos moleculares para identificação.

Pelo pequeno número de estudos prospectivos, a relação entre infecções virais e exacerbação da doença respiratória em FC ainda não está bem estabelecida. Há um grande interesse em se quantificar a gravidade e as consequências das infecções virais respiratórias neste grupo de pacientes, uma vez que a detecção mais precoce destas infecções virais pode vir a determinar mudanças terapêuticas, como o uso de drogas antivirais^{30, 72}, além de reforçar a orientação de tratamentos preventivos neste grupo de risco direcionado aos vírus que potencialmente podem estar associados a maiores danos e agravos⁷³⁻⁷⁴.

2. Objetivos

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a prevalência e o impacto clínico das infecções virais nos pacientes com fibrose cística acompanhados no ambulatório de Pneumologia do Instituto da Criança “Prof. Pedro de Alcântara”, do Hospital das Clínicas de São Paulo, no período de 01 ano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.2.1. Avaliar a prevalência de infecções respiratórias virais (Vírus Sincicial Respiratório, Influenza A e B, Parainfluenza 1, 2 e 3, Adenovírus, Coronavírus, Rinovírus, Metapneumovírus, Bocavírus e Enterovírus) nos pacientes com fibrose cística acompanhados na Unidade durante o período de 1 ano através de:

2.2.1.1. Imunofluorescência;

2.2.1.2. PCR / RT-PCR com detecção de produtos através de eletroforese capilar em seqüenciador automatizado.

2.2.2. Avaliar o impacto clínico e funcional das infecções virais nestes pacientes (exacerbação respiratória, hospitalizações, espirometria e oximetria de pulso).

2.2.3. Avaliar a associação entre infecções virais e isolamento de bactérias nas amostras de trato respiratório, com atenção especial para as infecções por *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Métodos

3. MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Pacientes com diagnóstico de fibrose cística pelos critérios de Rosenstein⁷⁵ e das diretrizes da *Cystic Fibrosis Foundation*⁷⁶, em acompanhamento na Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) sob protocolo número 925/05 (Anexo A).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos todos os pacientes de até 18 anos incompletos. Um folheto explicativo (Anexo B) foi elaborado e fornecido para os pais durante apresentação do estudo, antes do fornecimento do consentimento informado. Os pais ou responsáveis legais pelos pacientes assinaram o termo de consentimento informado (Anexo C) para inclusão. Os pacientes eram excluídos do estudo assim que completassem 18 anos, ou em caso de óbito.

3.2.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo foi prospectivo, longitudinal onde durante um ano (de 06 de setembro 2006 a 04 de setembro de 2007) e a cada visita médica foram coletados dados para adequado preenchimento do protocolo clínico, explicado a seguir.

3.2.3 PROTOCOLO CLÍNICO (COLETA DE DADOS)

O atendimento clínico dos pacientes incluiu anamnese e exame físico detalhado, oximetria de pulso e avaliação espirométrica dos pacientes com idade superior a seis anos. Os dados clínicos e funcionais obtidos foram registrados em protocolo específico (Anexo D). Na presença de dois ou mais achados como febre, aumento e/ou mudança do aspecto da secreção, piora da falta de ar, aumento da tosse, perda de peso, inapetência ou vômitos, piora da semiologia pulmonar em relação ao habitual do paciente, e funcionais (espirometria e oximetria) o paciente era definido como exacerbado²³⁻²⁴. Dentre as informações registradas, também foi utilizado o último escore de Shwachman-Kulczycki⁷⁷ (Anexo E) que é calculado anualmente durante o seguimento ambulatorial, e que avalia a gravidade da doença pela soma de quatro critérios: atividade física, exame físico com enfoque na semiologia e propedêutica pulmonar, estado nutricional e radiografia de tórax. Cada critério recebe uma pontuação de 5 a 25 pontos, onde os menores valores representam maior gravidade, e a somatória determinará a gravidade clínico-radiológica do paciente em questão.

3.2.3.1 OXIMETRIA DE PULSO

Realizada antes das manobras espirométricas, com o paciente em repouso, utilizando-se o oxímetro de pulso PalmSat 2500® (Nonin) com sensor adequado à idade e tamanho do paciente. Após estabilização, o valor de saturação de oxigênio mais freqüente durante o período de dois minutos foi registrado no protocolo clínico (Anexo D). Foi considerada redução significativa na oximetria de pulso quando ocorreu uma queda de $\geq 2\%$ em relação ao valor anterior do próprio paciente.

3.2.3.2 TESTES DE FUNÇÃO PULMONAR

Os pacientes acima de seis anos capazes de realizar manobras de espirometria foram submetidos ao exame em todas as consultas médicas. O exame foi realizado antes da coleta de secreção respiratória e sangue. O espirômetro portátil Koko® com filtros bacteriológicos descartáveis e individuais foi o equipamento utilizado no estudo.

Os parâmetros avaliados foram: capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) e o índice de Tiffeneau (VEF1/CVF). Os critérios de aceitação de curvas e reprodutibilidade foram aqueles publicados no último Consenso Brasileiro de Testes de Função Pulmonar⁷⁸. Foram utilizados os valores de referência de Polgar⁷⁹ ou Knudson⁸⁰ de acordo com a idade e estatura dos pacientes. A classificação em relação ao grau de obstrução brônquica utilizada foi a descrita no último consenso de espirometria da Academia Americana do Tórax e da Sociedade Respiratória Européia⁸¹, onde classifica-se a obstrução brônquica conforme os valores encontrados na espirometria. Cada espirometria foi então classificada como normal (valores normais) ou obstrução leve, moderada,

moderadamente grave, grave e muito grave conforme maior redução dos valores previstos para o paciente em questão. Nas avaliações seqüenciais dos pacientes a presença de queda do valor do VEF1 e/ou da CVF maior ou igual a 10% em relação ao exame anterior foi considerada como piora funcional, a exemplo do que é utilizado por outros autores como um dos critérios da caracterização da exacerbação pulmonar^{3, 6, 23}.

3.2.3.3 COLETA DE AMOSTRAS CLÍNICAS

As coletas foram realizadas em sala própria do ambulatório do Instituto da Criança HCFMUSP e encaminhadas em até duas horas para os respectivos laboratórios de análises com os cuidados de identificação, armazenamento e transporte adequados.

3.2.3.3.1 AMOSTRAS DE SANGUE

Foram colhidas 5ml por ocasião da entrada no estudo e após 12 meses. Estas amostras foram centrifugadas para obtenção do soro, que está estocado para avaliações posteriores relativas à resposta imune dos pacientes a antígenos bacterianos (*Pseudomonas aeruginosa*) e virais, oportunamente. As amostras foram conservados e transportados para o Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

3.2.3.3.2 COLETA DE ESCARRO OU ESFREGAÇÃO DE OROFARINGE

Através de expectoração em recipiente plástico estéril ou submetido à coleta de esfregaço de orofaringe, como descrito por da Silva Filho et al⁷⁰.

O material foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia do Instituto Adolfo Lutz.

3.2.3.3.3 COLETA DE LAVADO NASAL

Aspirados de nasofaringe foram coletados de duas maneiras diferentes conforme a idade do paciente mas com a mesma efetividade de identificação viral conforme descrito por Lambert et al⁸².

Nas crianças abaixo de quatro anos 1ml de solução salina estéril foi instilada em cada narina e na seqüência aspirado com sonda estéril, armazenando o produto em tubo também estéril. Nas crianças acima de quatro anos, foi realizada a técnica de lavado nasal sem uso da sonda (*nasal blow*), através de instilação de 1 ml da solução salina estéril na narina, elevação do queixo e posterior expiração nasal forte e abrupta, coletando-se a solução instilada junto com o muco nasal. Em ambas faixas etárias cada uma das narinas foi lavada separadamente, mas o produto resultante foi coletado apenas no recipiente estéril do paciente. Os lavados nasais foram conservados e transportados refrigerados para o Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Figura 1 - Fluxo de consultas, avaliações funcionais e coletas dos pacientes durante o estudo.

* colhido na primeira consulta e após 12 meses

3.3 DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES BACTERIANAS

Amostras de escarro (homogeneizadas com a adição de igual volume de uma solução estéril de N-acetil-L-cisteína a 0,5% em tampão fosfato, pH 6,8-7,2) e as amostras de orofaringe foram semeadas diretamente ou após diluições seriadas em meios seletivos. Foram utilizados os meios ágar chocolate, ágar MacConkey e meios seletivos para o complexo *B. cepacia* (*B. cepacia* selective medium, Oxoid), *S. maltophilia* (elaborado por Garcia, D.O., dados não publicados) e *Staphylococcus aureus* (Agar Baird Parker - Oxoid e/ou Agar Manitol) e incubadas a 37°C/16-48h.

Os bacilos Gram negativos isolados foram identificados fenotipicamente através de provas bioquímicas convencionais já implantadas na rotina do Setor de Enterobactérias e outros bacilos Gram negativos da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz. As provas foram: triagem em meio IAL, reação de oxidase e motilidade, oxidação de açúcares (glicose, manitol, trealose, xilose, adonitol, maltose, sacarose), crescimento a 4°C e 42°C e descarboxilação da aminoácidos (lisina, arginina e ornitina). Os cocos Gram positivos isolados são identificados fenotipicamente através das provas de catalase, coagulase e DNase.

3.4 DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES VIRAIS

3.4.1 PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS

O processamento inicial foi feito no Laboratório de Virologia do IMTSP-USP, na área de extração, em capela de fluxo laminar.

As amostras coletadas foram identificadas pelo nome vírusFC e um número seqüencial.

Cada amostra gerou seis alíquotas, como descrito abaixo. Os tubos contendo as amostras foram identificados pelo número.

3.4.1.1 O aspirado foi transferido do equipo ou do coletor para um tubo cônico de 15ml, normalizando-se o volume final para 3ml (utilizando-se solução fisiológica estéril).

3.4.1.2 Homogenização com vortex.

3.4.1.3 Separada uma alíquota de 1ml para a imunofluorescência - processamento imediato.

3.4.1.4 Separadas duas alíquotas de 200µl para extração de RNA/DNA (caixa RNA).

3.4.1.5 Separada uma alíquota de 600µl para centrifugação e separação de *pellet*/sobrenadante (caixa CENTRIF);

O restante, cerca de 1ml: estocado no congelador -80°C (caixa BRUTO).

3.4.2 TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA:

3.4.2.1 O *pellet* foi diluído em PBS para constituir uma solução levemente turva.

3.4.2.2 Acrescentou-se 25µl da solução levemente turva em lâmina de imunofluorescência.

3.4.2.3 Secagem do *blot* à temperatura ambiente ou na capela de segurança (só com a ventilação ligada).

3.4.2.4 Fixação com acetona gelada por cinco minutos à 4°C.

3.4.2.5 Preparadas duas lâminas para cada amostra; uma delas foi acondicionada (embrulhada em papel alumínio) no congelador a -70°C para posterior análise, se necessário.

Para melhor aproveitamento do material, as amostras foram inicialmente processadas utilizando-se um *pool* de monoclonais para vírus respiratórios

Screening Dako Imagen K6104[®] (Dako Lda Denmark House, Angel Drove, Cambs. CB74ET, UK).

3.4.2.6 Screening

3.4.2.6.1 Aguardou-se a evaporação da acetona da lâmina por 5 a 10 minutos

3.4.2.6.2 Adicionados 8µl do *pool*

3.4.2.6.3 Incubação em estufa a 37°C durante 15 minutos

3.4.2.6.4 Lavagem com PBS (5 minutos)

3.4.2.6.5 Adicionados 8µl de conjugado (anticorpo marcado com isotilcianato de fluoresceína)

3.4.2.6.6 Lavagem com PBS (5 minutos), secagem da lâmina e montagem para leitura em microscópio de fluorescência

3.4.2.6.7 As amostras positivas foram re-testadas especificamente para cada monoclonal

3.4.2.7 Confirmação do diagnóstico

Foi realizada com o *kit* Dako Imagen K6104[®] (Dako Lda. Denmark House, Angel Drove, Cambs, CB74ET, UK.).

3.4.2.7.1 Acrescentados 8µl/poço de cada anticorpo monoclonal (1 – VSR; 2 – Adeno; 3 – Flu A; 4 – Flu B; 5 – PIV)

3.4.2.7.2 Incubação durante 15 minutos em estufa a 37°C.

3.4.2.7.3 Lavagem com PBS durante 5 minutos.

3.4.2.7.4 Secagem e montagem para a leitura em microscópio de fluorescência.

3.4.3 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.4.3.1 EXTRAÇÃO DE *DNA* E *RNA* DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

As extrações de *DNA* e *RNA* viral foram realizadas através do emprego de *kit* comercial contendo colunas de sílica para purificação de ácidos nucleicos. O 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*.

3.4.3.2 SÍNTESE DE *cDNA* (*RT-PCR*)

A síntese de *cDNA* foi realizada utilizando-se o *kit High Capacity cDNA*® (*Applied Biosystems*), de acordo com as orientações do fabricante.

3.4.3.3 REAÇÃO DA CADEIA DE POLIMERASE (*PCR*)

A detecção do *cDNA* ou *DNA* (adenovírus e bocavírus humano) obtido das amostras de secreção respiratória foi realizada através da reação da cadeia de polimerase (*PCR*).

3.4.3.4 ESCOLHA DAS SONDAS INICIADORAS (*PRIMERS*):

Os *primers* foram escolhidos a partir de pesquisas na literatura direcionadas para cada uma das etiologias de interesse, procurando identificar aqueles capazes de gerar amplicómeros de tamanhos distintos (diferença mínima de cinco a 10 pares de bases) adequados para diferenciação no seqüenciador automatizado. Além

disso, procuramos escolher *primers* já testados anteriormente em amostras clínicas de características semelhantes (secreção respiratória). Os *primers forward* para cada etiologia viral foram sintetizados com marcação com FAM. A sequência dos *primers* com suas características e referências de origem estão apresentadas no quadro 1.

Quadro 1 - Sequência dos *primers* escolhidos para a identificação dos vírus respiratórios

Vírus	Nome do <i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Gene	Amplímero
VSR(83)	RSVAB-P1-FAM	GGA ACA AGT TGT TGA GGT TTA TGA ATA TGC	F	277
	RSVAB-P2	TTC TGC TGT CAA GTC TAG TAC ACT GTA GT		
PIV1(84)	HPIV1-F1-FAM	CCG GTA ATT TCT CAT ACC TAT G	HN	317
	HPIV1-R1	CCT TGG AGC GGA GTT GTT AAG		
PIV2(84)	HPIV2-F1-FAM	CCA TTT ACC TAA GTG ATG GAA T	HN	203
	HPIV2-R1	GCC CTG TTG TAT TTG GAA GAG A		
PIV3(84)	HPIV3-F1-FAM	ACT CCC AAA GTT GAT GAA AGA T	HN	102
	HPIV3-R1	TAA ATC TTG TTGTTG AGA TTG A		
Influenza A(85)	FLUA-F1-FAM	CTA AGG GCT TTC ACC GAA GA	NS1	192
	FLUA-R1	CCC ATT CTC ATT ACT GCT TC		
Influenza B(85)	FLUB-F1-FAM	ATG GCC ATC GGA TCC TCA AC	NS1	241
	FLUB-R1	TGT CAG CTA TTA TGG AGC TG		
Adenovírus(86)	AD1-FAM	CTG ATG TAC TAC ACC AGC ACT GGC AAC ATG GG	Hexon	608-629
	AD2	CGC TTG CGG TGG TGG TTA AAT GGG TTT ACG TTG TCC AT		
hMPV(87)	MPVF- F1	GAG CAA ATT GAA AAT CCC AGA CA	F	347
	MPVF- R1	GAA AAC TGC CGC ACA ACA TTT AG		
Picornavírus(88)	OL26	GCA CTT CTG TTT CCC C	5'NCR	383-392
	OL27	CGG ACA CCC AAA GTA G		
Coronavírus(89)	CORO1	TGA TGG GTT GGG ACT ATC CTA AAT GTG A	Pol 1b	220
	CORO2	GTA GTT GCA TCA CCG GAA GTT GTG CCA CC		
Bocavírus(90)	188F	GAC CTC TGT AAG TAC TAT TAC	NP1	354
	542R	CTC TGT GTT GAC TGA ATA CAG		
Controle de RNA(91)	β -Actina-Fwd-FAM	AAA TCG TGC GTG ACA TTA AGG	Beta-actina humana	525
	β -Actina-Rev	CTA AGT CAT AGT CCG CCTAG		

3.4.3.5 MÉTODO DE *PCR* E *RT-PCR* EM UMA PLACA:

As reações de *RT-PCR* e *PCR* foram realizadas em uma mistura única de reagentes, contendo 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 50mM KCl, 200nM de dNTPs, 2mM de MgCl₂ e 0,4μM de cada *primer*, 1U de *platinum Taq DNA polymerase*[®] (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 2,5μL de *cDNA* ou *DNA* em volume final de 25μL. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient[®] (Eppendorf), nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

O preparo da microplaca envolveu a utilização de pipetas multicanal e berços para acomodar maiores volumes de reagentes. Os *primers* foram pipetados nas colunas utilizando micropipetas eletrônicas em modo de repetição e a mistura da reação adicionada com pipeta multicanal usando 12 ponteiras. Por fim, as amostras foram acrescentadas nas linhas da placa, usando ponteiras individuais. Deste modo, em uma placa de 96 poços foram avaliadas seis amostras, um controle positivo e um controle negativo, para 12 diferentes reações de *PCR* ou *RT-PCR* (figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática da preparação das placas para reação da cadeia de polimerase para identificação de 11 vírus respiratórios

3.4.3.6 CONTROLES PARA TODAS AS ETAPAS DO MÉTODO:

A amplificação do gene da beta-actina foi utilizada como controle da extração e amplificação correta da amostra clínica. Além deste controle interno da reação (amplificação do gene da beta-actina), um plasmídeo contendo todas as seqüências alvo foi construído para ser utilizado como controle em todas as amplificações (Figura 3). Esta escolha levou em conta a possibilidade de se descartar contaminação de forma mais confiável e rápida, pois as seqüências contidas dentro de cada trecho amplificado do plasmídeo são distintas dos vírus selvagens. Além disso, uma seqüência conhecida de uma espécie vegetal está inserida neste plasmídeo, o que facilita sua caracterização por seqüenciamento em caso de suspeita de contaminação. Controles negativos (mistura de reagentes sem adição da amostra clínica) foram incluídos em todas as reações.

CTGATGTACTACAACAGCACTGGCAACATGGGTGTGCTGAAATCGTGCGTGACATTA
 AGGAGAAGCAGACTTCTCTTTTCCGGGTGACGACCTCTGTAAAGTACTATTACTTTCT
 TTAAAGGAACAAGTTGTTGAGGTTTATGAATATGCCAAACCATTTACCTAAGTGATGG
 AATCAATACCTCCCAAGTTGATGAAGATCTATACCAGGAGGTTGTGTCTTGTATCT
 AAGGGCTTTCCACCGAAGATGAAAAAGAAGATTCATGTCACCAACATATTA
 AACTGAGACTTGCTTTCTATTATTATAATGATACCTTTATTGAAAGAGTCATACTCTTCC
 AAATACAACAGGGCGGTGTGATTAACACTAGTTGACTAGACTTGACAGCAGAAAA
 TACATTAATGAAAGATACACTGTATTTCAGTCAACACAGAGGATACCTGCGGT
 TCCCGCCTCGCTCCGGTAATTTCTCATACCTATGATCAGCAAATGGCCATCGGATCC
 TCAACGCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAGGCGGACTATGACTTAGTCGC
 TGGACCCCCTGGACAACGTAAACCCATTAAACCACCACCGCAACGCGGGCCGAGCAA
 ATTGAAATCCCGACAAATCAAGATTGATGGGTTGGGACTATCCTAAATGTGAGCT
 ACAGCAGCAGCAGTCACAGCAGGCATTGCAATAGCCAGCTCCATAATAGCTGACAGT
 GAGGTGAATGCAATTAAAGGTGCCTTAACAAGTCCGCTCCAAAGAGTATCCACATTA
 GGAAAAGGTATTATTACACGACCTTGACTATCAAAGAGCTGAAAGGGTGGCAACAC
 TTCCGGTGATGCAACTACATCAACAGGAACAAATGTGACATTGCTGATCTGAAGATG
 GCTGTCAGCTTCAGTCAATTCAACAGAAGATTTCTAAATGTTGTGCGGCAGTTTTC

Lista de vírus

hMPV - 347pb
 Adenovírus - 613pb
 B-actina - 527pb
 Picorna - 394pb
 Boca - 354pb
 RSV - 277pb
 PIV 2 - 204pb
 PIV 3 - 103pb
 Flu A - 192pb
 PIV 1 - 317pb
 Flu B - 241pb
 Corona - 220pb

Sequência de organismo vegetal

Figura 3 - Representação do plasmídeo contendo todas as seqüências alvo

3.4.3.7 REVELAÇÃO DOS PRODUTOS NO SEQUENCIADOR AUTOMATIZADO:

Após a amplificação, as amostras de cada linha foram misturadas (10µl de cada poço da placa). Este *pool* foi transferido para uma nova placa para leitura no sequenciador, contendo, portanto, 72 diferentes amostras (Figura 4). Os produtos foram analisados e quantificados utilizando o Analisador Automático de DNA MegaBACE® (General Electric Healthcare, Amersham Biosciences). Um padrão de peso molecular marcado com outra fluorescência (MegaBACE® ET900-R Standard marcado com ROX) foi misturado a cada uma das amostras para a corrida

eletroforética, a fim de permitir a adequada identificação do tamanho do fragmento marcado com FAM. As corridas eletroforéticas foram realizadas em capilares preenchidos por polímero (MegaBACE® Long Read Matrix), sob uma corrente elétrica de cerca de 15.000 volts. Os fragmentos marcados foram detectados através de feixe a laser e em seguida analisados pelo programa MegaBACE® Fragment Profiler (Version 1.2, Amersham Biosciences), que é capaz de determinar o tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) e a intensidade da fluorescência em Unidades relativas de Fluorescência (URF), Figura 5.

Figura 4 - *Pool* formado a partir de uma linha da placa para corrida eletroforética capilar em seqüenciador de DNA

Figura 5 - Imagem dos resultados de uma amostra de amplificação de controle positivo no *Software* FragmentAnalysis® (GE Healthcare) – picos das diferentes amplificações

3.4.3.8 DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR RINOVÍRUS E ENTEROVÍRUS

As amostras identificadas como positivas para Picornavírus foram submetidas à *PCR* em tempo real direcionada à amplificação da região 5'NCR. O protocolo emprega sondas do tipo Taqman (Applied Biosystems, PE Europe B.V.) e a amplificação e detecção de produtos realizada em aparelho ABI Prism 7300® (Applied Biosystems, PE Europe B.V.). Este método foi descrito inicialmente por Deffernez et al.⁹², e testado no nosso Laboratório com implementação de pequenas alterações (incluído uma etapa de leitura com temperatura de 60°C por um minuto) para a identificação de rinovírus. Este ajuste teve por objetivo eliminar inespecificidade observada em estudo anterior, em que amostras positivas foram

seqüenciadas e identificadas seqüências de *DNA* humano (dados não publicados).

O protocolo utilizado no estudo está apresentado abaixo:

Seqüência dos *primers* para rinovírus:

Forward: 5'-GCA CTT CTG TTT CCC C-3'

Reverse: 5'-GGC AGC CAC GCA GGC T-3'

Probe RHP1: FAM (5'- AGC CTC ATC TGC CAG GTC TA-3') TAMRA

Probe RHP2 : VIC (5'- AGC CTC ATC GAC CAA ACT A-3') TAMRA

Mistura de reagentes:

Rhino		
	μ l	[final]
Taqman Mastemix 2X	12,5	1X
forward primer 10uM	2,25	900 nM
reverse primer 10uM	1,5	600 nM
probe RHP1 10uM	0,5	200nM
probe RHP2 10uM	0,5	200 nM
H2O	2,75	
<i>cDNA</i>	5	
Volume final	25	

Parâmetros de amplificação/detecção:

2min	50°C	} 55 ciclos	→ leitura da fluorescência nesta fase
10min	95°C		
15seg	95°C		
30seg	55°C		
1min	60°C		

Seqüência dos *primers* para enterovírus:

Forward: 5'-CCC CTG AAT GCG GCT AAT-3'

Reverse: 5'-CAA TTG TCA CCA TAA GCA GCC A-3'

Probe A: FAM (5'-GGA CAC CCA AAG TAG TCG GTT CCG CTG C-3') TAMRA

Probe B: FAM (5'-GAG TTG CCC GTT ACG ACA CAT GCC C-3') TAMRA

Mistura de reagentes:

Entero		
	μl	[final]
Taqman Mastemix 2X	12,5	1X
forward primer 10uM	0,75	300nM
reverse primer 10uM	0,75	300nM
probe A 10uM	0,5	200nM
probe B 10uM	0,5	200nM
H ₂ O	5	
cDNA	5	
Volume final	25	

Parâmetros de amplificação/detecção: **3.4.3.9 SEQÜENCIAMENTO DE AMPLÍMEROS PARA VERIFICAÇÃO DE****DISCREPÂNCIAS E CONFIRMAÇÃO DE IDENTIDADES:**

Para o seqüenciamento de amplicómeros das amostras selecionadas foram utilizados os *primers* de cada um dos alvos em questão, utilizando-se para reação de seqüência o *kit* Big Dye Terminator[®] (Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA). As corridas eletroforéticas foram realizadas no aparelho de seqüenciamento automatizado ABI PRISM 377[®] (Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA) do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP. Os resultados obtidos foram comparados com dados do Genbank utilizando o programa BLAST, disponível no Centro Nacional para Informação Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.5 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 preenchido diariamente no sentido de impedir o extravio de amostras. Um *software* para entrada de dados via internet foi desenvolvido e pode ser acessado em www.virusfc.com.br/. Após a finalização da entrada dos dados clínicos e laboratoriais, estes foram exportados para planilhas do programa Excel® 2003 e Access® 2003 (Microsoft®) para a realização dos cálculos.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística descritiva dos dados demográficos foi feita pelo cálculo da distribuição de frequências para as variáveis categóricas e médias $\pm$ desvios padrão ou medianas, mínimos e máximos para variáveis quantitativas. Para avaliação dos fatores de risco relacionados aos desfechos estudados em amostras colhidas repetidas nos mesmos sujeitos foram utilizados modelos de equação de estimação generalizadas (EEG) com distribuição binomial. Os resultados foram expressos em odds ratio (OR) e intervalos de confiança de 95%.

O banco de dados foi construído utilizando o programa *MICROSOFT ACCESS*®. A análise estatística foi desenvolvida com auxílio dos programas *EPI-INFO*® 2000 (*Centers for Disease Control and Prevention & World Health Organization*), *GraphPad Prism for Windows*®, versão 4.0 e *SPSS 15*. Foi adotado o nível de significância $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$).

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 COLETAS E AVALIAÇÕES CLÍNICAS

Dos 104 pacientes de até 18 anos incompletos que passaram em consulta durante o período de estudo 103 concordaram em participar. A única recusa foi de um lactente com diagnóstico recente de FC. Nenhum paciente foi excluído por óbito, mas dois pacientes foram excluídos durante a pesquisa por terem atingido a idade limite. Neste caso as amostras referentes a esses paciente que foram coletadas antes dos 18 anos fazem parte do pool de coletas deste estudo.

4.1.1 DADOS DEMOGRÁFICOS

Foram realizadas 408 coletas de amostras de 103 pacientes com fibrose cística (49 sexo feminino e 54 sexo masculino) atendidos no Ambulatório de Pneumologia Pediátrica do Instituto da Criança de 06 de setembro de 2006 a 04 de setembro de 2007. A mediana do escore clínico-radiológico de Shwachman-Kulczycki foi de 75, com valor mínimo de 35 e máximo de 95. A saturação média encontrada foi de 94% $\pm$ 4% (tabela 1). A idade oscilou de 3,8 meses a 17,8 anos, com mediana de 8,9 anos e média de 9,4 $\pm$ 4,8 anos. A distribuição por idade da população estudada está apresentada na figura 6.

Tabela 1 - Dados demográficos e características gerais dos pacientes

Características	N = 103
Idade (anos), média $\pm$ DP	9,4 $\pm$ 4,8
Sexo (n) masculino/feminino	54/49
Escore clínico Shwachman-Kulczycki, mediana	75
Saturação arterial de O ₂ , média $\pm$ DP	94 $\pm$ 4

DP = desvio padrão

Figura 6 - Distribuição do número de pacientes por idade da população estudada (n=103)

4.1.2 TIPO DE CONSULTA, TIPO DE COLETA E SITUAÇÃO CLÍNICA

Os pacientes foram atendidos pelo menos uma vez e o número máximo de consultas foi de nove por paciente (mediana: 4 atendimentos).

Em 363 vezes as consultas foram de rotina e 45 consultas não foram agendadas, isto é, consultas emergenciais ou fora da rotina. Independentemente do tipo de consulta realizada, os pacientes foram considerados como exacerbados em 142 consultas, enquanto foram considerados estáveis em 266 consultas. Em 28,4% das consultas de rotina os pacientes estavam exacerbados, enquanto a exacerbação esteve presente em 89% das consultas não agendadas ($p < 0,0001$). A figura 7 ilustra a presença ou não de exacerbação em relação ao tipo de consulta efetuada.

Figura 7 - Diagnóstico de exacerbação respiratória em relação ao tipo de consulta

Totalizamos 208 amostras de orofaringe e 200 de escarro para pesquisa de bactérias. A mediana de idade dos pacientes que colheram amostras de orofaringe foi 5,7 anos e de 11,7 anos para os que colheram escarro ($p < 0,0001$). Quanto às amostras para pesquisa viral, foram colhidas 68 amostras por aspirado nasofaríngeo (mediana de idade: 2,7 anos) e 340 amostras pela técnica de nasal *blow* (mediana de idade: 10,7 anos), $p < 0,0001$.

4.1.3 AVALIAÇÃO FUNCIONAL

A espirometria foi realizada em 227 ocasiões. A idade oscilou entre 5,8 e 17,8 anos e observamos algum grau de obstrução brônquica em 183 ocasiões (80,6%), enquanto espirometria normal foi observada em 44 (19,4%) das consultas (tabela 2).

Tabela 2 - Situação funcional dos pacientes avaliada por espirometria (n=227)

Gravidade da obstrução	n	% avaliações
Muito grave	52	22,9%
Grave	27	11,9%
Moderadamente grave	20	8,8%
Moderado	31	13,7%
Leve	53	23,3%
Normal	44	19,4%

A saturação de oxigênio por oximetria de pulso foi aferida em 398 ocasiões. Em 44 ocasiões os pacientes apresentaram valores abaixo de 90%, e em 42 ocasiões observamos valores entre 90 e 92%. Nas restantes 312 consultas os valores encontrados foram iguais ou superiores a 93% (tabela 3).

Tabela 3 - Saturação arterial de oxigênio medida por oximetria de pulso (n=398)

Saturação arterial de oxigênio	n	% avaliações
< 85%	7	1,8%
85 – 89%	37	9,3%
90 – 92%	42	10,6%
> 92%	312	78,4%

4.1.4 SINTOMAS POR OCASIÃO DA COLETA

Os questionários clínicos continham perguntas sobre os sintomas dos últimos cinco dias, sintomas de infecção respiratória aguda e critérios utilizados para definir a exacerbação respiratória. Na tabela 4 apresentamos os dados do questionário de sintomas nos últimos cinco dias onde tosse produtiva, tosse seca, coriza e obstrução nasal foram as queixas mais comuns.

Tabela 4 - Sintomas dos últimos cinco dias relatados no questionário clínico

Sintomas últimos cinco dias	n	%
Obstrução nasal	110	27,0%
Coriza	109	26,7%
Febre	49	12,0%
Dor de garganta	36	8,8%
Dores no corpo	22	5,4%
Diarréia	18	4,4%
Tosse produtiva	229	56,1%
Tosse seca	106	26,0%
Chiado	41	10,0%

Em relação aos sintomas valorizados para definição da exacerbação pulmonar encontramos em 29,2% das ocasiões a presença de dois ou mais critérios, conforme podemos evidenciar na tabela 5.

Tabela 5 - Prevalência de sinais e/ou sintomas utilizados na definição de exacerbação da doença respiratória (n=408)

Parâmetro clínico	n	%
Febre	49	12,0%
Aumento da quanti/e de secreção e/ou intensidade da tosse	139	34,1%
Mudança de aspecto da secreção	76	18,6%
Piora do cansaço ou falta de ar	82	20,1%
Inapetência, vômitos pós tosse	54	13,2%
Perda de peso recente	53	13,0%
Pacientes com dois ou mais critérios	119	29,2%

4.2 RESULTADOS DE CULTURAS

Foram realizadas 404 culturas das 408 amostras colhidas, pois quatro amostras foram extraviadas. Não houve identificação de microrganismo patogênico em 31 amostras (7,7%). Conforme mostra a tabela 6 houve predomínio de *S. aureus* (277 amostras, 68,6%) e *P. aeruginosa* (165 amostras, 40,9%).

Tabela 6 - Distribuição das bactérias identificadas nas culturas bacterianas das 404 amostras

PATÓGENO	N	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	277	68,6%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	165	40,8%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	37	9,2%
Bacilo gram negativo não fermentador	25	6,2%
<i>Burkholderia cepacia</i>	15	3,7%
<i>Haemophilus sp</i> **	10	2,5%
<i>Klebsiella sp.</i>	10	2,5%
<i>Enterobacter sp.</i>	8	2,0%
<i>Escherichia coli</i>	5	1,2%
<i>Burkholderia gladioli</i>	3	0,7%
<i>Achromobacter xylosoxidans subs.xylosoxidans</i>	1	0,2%
<i>Serratia sp.</i>	1	0,2%
<i>Shewanella putrificians</i>	1	0,2%
Ausência de identificação de bactéria patogênica	31	7,7%
Cultura não realizada	4	1,0%

Frequentemente mais de um patógeno identificado por amostra

* 58 cepas mucóides (mediana idade 13,3 anos) e 107 cepas não mucóides (mediana de idade 8,8 anos)

** pesquisa em apenas 10% das amostras

4.3 RESULTADOS DE VIROLOGIA

4.3.1 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Apenas quatro (1%) resultados de imunofluorescências foram positivos, sendo dois para VSR, um para parainfluenza 1 e um para influenza B. Das 24 amostras identificadas pela biologia molecular que seriam passíveis de identificação pela imunofluorescência, somente quatro (16,7%) tiveram resultado positivo.

4.3.2 MÉTODOS MOLECULARES

Através deste método identificamos pelo menos um agente viral em 203 das 408 amostras (49,8%) e o rinovírus foi o principal agente identificado. A distribuição da exacerbação para cada tipo de vírus identificado está na tabela 7.

Tabela 7 - Vírus respiratórios identificados em amostras de nasofaringe de pacientes portadores de fibrose cística (n=408)

Vírus	n	Exacerbação	% total coletado(408)
Rinovírus	139	48	34,1%
Enterovírus	24	11	5,9%
Bocavírus humano	23	9	5,6%
Coronavírus	19	6	4,7%
Vírus sincicial respiratório	15	8	3,7%
Influenza A	4	3	1,0%
Metapneumovírus humano	3	2	0,7%
Influenza B	1	0	0,2%
Parainfluenza 1	1	1	0,2%
Parainfluenza 2	1	1	0,2%
Parainfluenza 3	1	1	0,2%
Adenovírus	1	1	0,2%

Ao todo 232 vírus foram detectados (figura 8) pois co-infecções virais foram observadas em 26 amostras, sendo 23 amostras com identificação de dois vírus (19 delas envolvendo rinovírus como um dos agentes) e três amostras com identificação de três vírus (tabela 8).

Figura 8 - Distribuição do total de vírus identificados (n=232)

Tabela 8 - Co-infecções virais identificadas em 26 amostras de nasofaringe de pacientes portadores de fibrose cística (n=408)

Co-infecções	n
Rinovírus e bocavírus	8
Rinovírus e VSR	4
Rinovírus e coronavírus	3
Rinovírus e metapneumovírus humano	1
Rinovírus e influenza B	1
Rinovírus e adenovírus	1
Enterovírus e metapneumovírus humano	1
Enterovírus e coronavírus	1
Enterovírus e bocavírus	1
Enterovírus e VSR	1
Enterovírus e parainfluenza 1	1
Enterovírus, coronavírus e influenza A	1
Rinovírus, coronavírus e VSR	1
Enterovírus, bocavírus e VSR	1
Total de co-infecções	26

4.3.2.1 Infecções virais e idade

A idade dos pacientes com identificação de pelo menos um vírus na amostra não foi menor do que naqueles sem identificação viral (figura 9). Em relação aos vírus mais prevalentes, apesar da tendência sugerida nos gráficos da menor idade no grupo com identificação viral por VSR e enterovírus (figuras 10 e 11), não houve diferença significativa.

Figura 9 - Box-plot da distribuição de idades dos grupos vírus negativo e vírus positivo, representando intervalos interquartis, mediana e limites máximo e mínimo das idades representados pelas linhas externas ao quadro
* equação de estimação generalizada

Figura 10 - Box-plot da distribuição de idades dos grupos VSR+ (vírus sincicial respiratório positivo) e VSR- (vírus sincicial respiratório negativo), representando intervalos interquartis, mediana e limites máximo e mínimo das idades representados pelas linhas externas ao quadro, em pontos vermelhos aqueles de distribuição não normal
* equação de estimação generalizada

Figura 11 - Box-plot da distribuição de idades dos grupos entero - (enterovírus negativo) e entero+ (enterovírus positivo), representando intervalos interquartis, mediana e limites máximo e mínimo das idades representados pelas linhas externas ao quadro

* equação de estimação generalizada

4.3.2.2 Infecções Virais e Sazonalidade

A identificação de pelo menos um vírus ao longo do período de estudo está apresentada na figura 12. Os meses de dezembro, janeiro, fevereiro e julho tiveram menor quantidade de coletas. A menor positividade foi observada em dezembro (25%), a maior em abril (65%), e a positividade geral das amostras foi 49,7%.

Os dados de sazonalidade para cada um dos vírus estudados mostram que o rinovírus ocorreu durante todo ano, com predomínio em março, abril e agosto de 2007 (figura 13). O enterovírus não mostrou sazonalidade muito definida, com casos presentes na maioria dos meses avaliados (figura 14) enquanto o bocavírus humano foi identificado preferencialmente nos meses de setembro, janeiro e março (figura 15).

Figura 12 - Distribuição da coleta de amostras e positividade (identificação de pelo menos um vírus) ao longo do período de estudo (n=408)

Figura 13 - Distribuição sazonal do rinovírus ao longo do estudo (n=139)

Figura 14 - Distribuição sazonal do enterovírus ao longo do estudo (n=24)

Figura 15 - Distribuição sazonal do bocavírus ao longo do estudo (n=23)

O coronavírus humano foi mais identificado nos meses de inverno e primavera (figura 16). Com relação ao VSR, observamos um maior número de amostras positivas nos meses de outono e inverno, mas nenhuma amostra positiva foi identificada nos meses de maio e julho (figura 17).

Figura 16 - Distribuição sazonal do coronavírus ao longo do estudo (n=19)

Figura 17 - Distribuição sazonal do VSR ao longo do estudo (n=15)

4.3.2.3 Persistência Viral

Alguns vírus apresentaram persistência da identificação viral em amostras seqüenciais. Isso ocorreu em nove pacientes com identificação de rinovírus por até 35 dias após a primeira detecção (mediana de 27 dias; de sete a 35 dias). Em dois pacientes com detecção de bocavírus encontramos resultados concordantes em amostras com intervalo de até seis meses, negatizando respectivamente no sétimo e oitavo mês após coleta inicial. Um único paciente apresentou identificação de influenza A em duas amostras com intervalo de 14 dias entre as coletas.

4.3.3 IMPACTO CLÍNICO DAS INFECÇÕES VIRAIS

Os sintomas de coriza e obstrução nasal foram os mais freqüentes e estiveram associados à identificação viral nas amostras (tabela 9).

4.3.4 INFECÇÕES VIRAIS E PRINCIPAIS DESFECHOS

Não verificamos a associação entre identificação viral com a exacerbação da doença (OR=1,063; IC 95%=0,979-1,154; p=0,144), nem com internação hospitalar. Quanto aos parâmetros funcionais, piora da espirometria e queda da oximetria, não se associaram com alguma identificação viral. Não houve associação entre identificação viral e isolamento bacteriano para os quatro patógenos de maior prevalência e relevância clínica para os pacientes com FC (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, complexo *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia*).

Tabela 9 - Associação entre os sintomas relatados nos cinco dias precedendo a consulta e identificação viral

Sintomas últimos 5 dias	vírus positivo	total	OR	IC 95%	p^*
Coriza	68	109	1,144	1,051-1,244	0,002
Obstrução nasal	64	110	1,094	1,003-1,193	0,043
Febre	24	49	1,000	0,941-1,061	0,990
Dor de garganta	21	36	1,034	0,973-1,098	0,285
Dores no corpo	9	20	1,002	0,962-1,044	0,922
Diarréia	7	17	0,980	0,945-1,016	0,269
Tosse seca	38	103	0,892	0,817-0,974	0,011
Tosse produtiva	113	228	1,003	0,918-1,096	0,947
Chiado	20	41	,992	0,935-1,053	0,800

* equações de estimação generalizadas (EEG)

4.3.4.1 Infecções por rinovírus e principais desfechos

As infecções por rinovírus não se associaram a exacerbação respiratória (tabela 10) nem a internação hospitalar, porém foi o principal vírus identificado tanto nos pacientes estáveis (91/266, 34,2%) como nos agudizados (48/142, 33,8%).

Isolamos assim os subtipos de rinovírus em 87 das 139, encontrando o subtipo A em 36 amostras (41,4%), o subtipo B em 23 (26,4%) e os subtipos A2 em 14 (16,1%) e o subtipo C em 14 (16,1%) (figura 18).

Três análises foram realizadas (tabela 10):

- Amostras infectadas somente com os subtipos A ou B: não houve associação com exacerbação respiratória;
- Amostras com detecção de somente os subtipos A2 ou C: associação com exacerbação respiratória esteve presente

- Todas as amostras infectadas excluindo-se somente aquelas com identificação de rinovírus dos subtipos A ou B, encontramos associação com exacerbação respiratória (tabela 10).

Figura 18 - Distribuição dos subtipos de rinovírus identificados (n=87)

Tabela 10 - Associação entre o diagnóstico de exacerbação da doença respiratória e a identificação de rinovírus e os subtipos de rinovírus nas amostras de nasofaringe

Vírus identificado	N	OR	IC 95%	<i>p</i> *
Rinovírus	139	1,020	0,931-1,117	0,666
Rinovírus A ou B	59	0,985	0,872-1,113	0,807
Rinovírus A2 ou C	28	1,213	1,027-1,432	0,023
Vírus positivo exceto Rinovírus A ou B	92	1,204	1,091-1,330	<0,001

* equações de estimação generalizadas (EEG)

4.3.4.2 Infecções por outros vírus e principais desfechos

Houve associação entre admissão hospitalar e infecção por influenza A (OR=1,988; IC 95%=1,238-3,194; $p=0,004$). Esta associação não esteve presente para nenhum outro vírus.

Não houve associação entre agudização respiratória e a identificação dos vírus mais prevalentes (tabela 11). Na ausência do rinovírus a identificação de algum outro vírus respiratório se associou com agudização (OR=1,195; IC 95%= 1,043-1,368; $p=0,01$) (tabela 10).

Tabela 11 - Associação entre o diagnóstico de exacerbação da doença respiratória e a identificação de vírus nas amostras de nasofaringe

Vírus identificado	N	OR	IC 95%	p^*
Qualquer vírus positivo	203	1,063	0,979-1,154	0,144
Rinovírus	139	1,020	0,931-1,117	0,666
Enterovírus	24	0,922	0,752-1,130	0,433
Bocavírus	23	0,952	0,793-1,142	0,593
Coronavírus	19	1,062	0,835-1,349	0,625
VSR	15	0,837	0,688-1,018	0,074
Vírus positivo exceto Rinovírus	64	1,195	1,043-1,369	0,010

* equações de estimação generalizadas (EEG)

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Este estudo evidenciou uma alta taxa de identificação viral em crianças e adolescentes com fibrose cística, independente da situação clínica de estabilidade ou exacerbação da doença respiratória, com nítido predomínio da identificação de rinovírus. Analisando as infecções virais como um todo, não houve associação entre infecção viral e exacerbação da doença respiratória, mas excluindo-se as amostras com rinovírus da análise, esta associação foi demonstrada ($OR=1,19$, $p=0,01$). De modo inédito, observamos que apesar da alta frequência de rinovírus em indivíduos assintomáticos, a identificação dos subtipos A2 e C esteve associada ao maior risco de exacerbação, aspecto já relatado na literatura para outras doenças respiratórias como asma e bronquiolite⁹³⁻⁹⁶.

Este achado vem de encontro ao objetivo principal deste estudo que foi a identificação viral usando recursos modernos e sofisticados, com intuito de evitar resultados falsos negativos. Comparando nossos resultados com o que há publicado, achado semelhante só é descrito nos pacientes com exacerbação respiratória, como podemos ver no trabalho de Armstrong et al.²⁶, que relata viroses respiratórias em 52% dos lactentes com FC hospitalizados e na recente pesquisa de Wat et al.⁵¹, onde há identificação viral em 46% das exacerbações respiratórias, contra 17% de identificação viral em consultas de rotina.

Nosso resultado, numericamente superior em termos de positividade de amostras de pacientes assintomáticos, reflete a sensibilidade da técnica

adotada, além da contemplação de um maior número de etiologias virais. Não observamos na literatura nenhum estudo sistemático com a investigação de 12 diferentes vírus respiratórios e incluindo a identificação de agentes nunca antes descritos em FC, como os subtipos A2 e C de rinovírus e o bocavírus humano.

O desenho do estudo, de uma pesquisa longitudinal, prospectiva, com duração de 12 meses, teve por objetivo a abrangência das variações sazonais na incidência dos diferentes agentes e uma avaliação mais fidedigna do real impacto clínico-funcional das infecções virais nesta população. Nosso ambulatório, especializado em doenças respiratórias da infância, acompanha um número significativo de crianças com fibrose cística, principalmente em idade escolar, aspecto refletido pela mediana de idade de nossa casuística de 8,9 anos. A faixa etária da população estudada também explica o perfil de gravidade, pois a mediana do escore clínico-radiológico de Shwachman-Kulczycki foi de 75 e uma proporção significativa dos pacientes (35%) apresentava obstrução grave ou muito grave na espirometria, refletindo uma população composta de adolescentes com doença avançada entre os pacientes incluídos.

A distribuição etária da nossa casuística, por outro lado, influenciou o impacto clínico observado para etiologias como o vírus sincicial respiratório, agente sabidamente de grande importância para lactentes, que em nosso estudo não esteve significativamente associado a risco de exacerbação. Armstrong et al²⁶, em estudo realizado na Austrália, descreveu um impacto significativo das infecções por VSR em lactentes com FC, tanto como causa de internação hospitalar como num provável papel facilitador na aquisição de *P. aeruginosa*. Em nosso estudo, apenas três pacientes tinham idade inferior a

dois anos na inclusão, e um deles teve uma grave infecção por VSR, com internação hospitalar e evolução com importante deterioração clínica. Deste modo, a falta de impacto observada para o VSR certamente está associada à faixa etária avaliada. Seguindo esta linha de raciocínio, Clifton et al.²⁷, em um estudo retrospectivo baseado em sorologias, concluíram que as infecções por influenza A, influenza B, adenovírus e vírus sincicial respiratório são irrelevantes para adultos com FC. Não existe, até o momento, estudo prospectivo de avaliação de infecções respiratórias virais na população adulta com FC que tenha empregado métodos diagnósticos mais apropriados na investigação.

Como já era esperado os sintomas e queixas mais comuns relativos ao acometimento de vias aéreas superiores foram obstrução nasal e coriza, e se associaram a detecção viral. Achado semelhante é descrito por Wat et al.⁵¹, onde sintomas como coriza e dor de garganta se associaram a identificação viral durante as exacerbações respiratórias. De forma contrária, no estudo de Olesen et al.⁵³ a presença de qualquer um dos sintomas como coriza, espirros ou febre teve um baixo valor preditivo positivo nos casos com infecção viral.

Em relação aos sintomas de vias aéreas inferiores a tosse produtiva esteve presente em 56% das ocasiões. Ela é uma característica da doença supurativa crônica, pode estar presente mesmo em momentos de estabilidade clínica e também não foi usada nos outros estudos como fator preditivo de infecção viral.

Também previsto, em 89% das visitas não agendadas o paciente preenchia critérios de exacerbação respiratória, enquanto nas consultas rotineiras os pacientes foram considerados estáveis em 72% das vezes.

Verificamos como principais desfechos da associação das infecções virais a exacerbação respiratória, a queda da oximetria, a perda de função pulmonar e a necessidade de hospitalização. Para definir exacerbação adaptamos os principais sinais e sintomas relatados pelos principais estudos^{3,6} e associamos também os dados funcionais que seriam coletados a cada visita. Consideramos então que na presença de dois ou mais achados positivos, definiríamos a exacerbação respiratória, como descrito anteriormente (Capítulo Métodos, página 18).

Inexiste um consenso ou diretriz rígida e universal validada cientificamente para definição da exacerbação pulmonar do paciente com FC. Esta questão já foi inclusive discutida por vários autores²³⁻²⁴ e, mesmo nos grandes estudos os critérios não coincidem^{3,6}. Outros trabalhos usam critérios subjetivos para tal definição⁵¹.

Os vírus mais identificados foram rinovírus, enterovírus, bocavírus, coronavírus e VSR, nesta ordem. Este resultado é semelhante ao estudo recente de van Ewijk et al.³⁰ que pesquisando 11 vírus encontrou rinovírus, enterovírus e coronavírus (bocavírus não foi pesquisado) como os três principais vírus detectados em crianças de até sete anos com FC durante seis meses de uma temporada de outono-inverno. Olesen et al.⁵³, encontrou num painel de sete vírus pesquisados uma maioria absoluta de rinovírus (87%), seguido por parainfluenza em 6%. Este estudo não contemplou a pesquisa de enterovírus, bocavírus nem coronavírus. Rinovírus também foi o mais detectado por Wat et al.⁵¹, seguido por parainfluenza 4, influenza A e influenza B, onde foram pesquisados nove vírus.

Das 24 amostras contendo vírus passíveis de detecção pela imunofluorescência, identificamos apenas quatro. Este achado vem reforçar a importância do uso de métodos moleculares para investigação de infecções respiratórias virais³². Uma justificativa para este achado poderia ser o processamento inicial das amostras, que incluiu normalização do volume através da adição de solução fisiológica, produzindo um efeito dilucional. Isso não nos pareceu ser o caso, já que a profissional envolvida no processo de imunofluorescência relatou sempre boa qualidade das amostras, com presença adequada de células epiteliais, o que determinou a manutenção do processamento inicial das amostras durante todo o estudo.

Apesar da baixa taxa de detecção de influenza A sua identificação se associou a internação hospitalar. Este dado é descrito na literatura⁵¹ e reforça a importância enfatizada pelos clínicos quanto à prescrição anual de vacina contra a gripe sazonal para este grupo de pacientes⁷⁴.

Co-infecções ocorreram em 6,4% das amostras (26 no total), mas em 19 amostras (73,1%) envolveram o rinovírus com mais um ou dois outros vírus. Olesen et al.⁵³ identificaram uma única co-infecção (rinovírus e influenza A), enquanto Wat et al.⁵¹ relatam seis casos de co-infecção. Este achado, que é influenciado pela metodologia escolhida, não chegou a ser valorizado nas outras publicações de pacientes com FC, mas é descrito em outros estudos que usaram técnicas de biologia molecular semelhantes às empregadas nesta pesquisa⁹⁷⁻⁹⁸. Nestes estudos, o rinovírus também aparece como o principal agente envolvido nas co-infecções.

A hipótese inicial de nosso estudo foi que as infecções respiratórias virais representariam uma significativa causa de exacerbação em pacientes

com FC. Entretanto, isso não foi observado. O que verificamos foi um evidente predomínio da identificação de rinovírus, tanto nas exacerbações como nos pacientes estáveis.

Em trabalho recente van Ewijk et al.³⁰ encontra ao menos uma identificação de rinovírus em todas as crianças do grupo de estudo com FC e também do grupo controle durante período sazonal de outono-inverno. Uma das possíveis explicações para tal resultado seria a alta incidência de infecções assintomáticas do rinovírus, fato que parece ser mais importante inclusive nos pacientes acima de sete anos⁹⁹. Nossa identificação de rinovírus também foi destituída de maiores repercussões clínico-funcionais, o que coincide com achados de Olesen et al⁵³.

Encontramos uma alta taxa de detecção do rinovírus tanto nas exacerbações 33,8% (48/142) como em 34,2% (91/266) dos pacientes estáveis. Pelo grande volume de rinovírus identificados e a ausência de associação com os principais desfechos procuramos aprofundar estes resultados. Assim foi possível pesquisar os subtipos de rinovírus em 87 dos 139 detectados. Avaliando os subtipos notamos que praticamente dois terços destes 87 (67,8%) eram dos subtipos A e B, enquanto 28 (32,2%) eram dos subtipos A2 e C. Considerando que os subtipos A2 e C são potencialmente mais agressivos⁹³⁻⁹⁵, imaginamos que houve um efeito de diluição quando a análise foi feita em conjunto com os rinovírus A e B que representavam a grande maioria da totalidade dos rinovírus. Para confirmar tal suspeita avaliamos os subtipos A2 e C isoladamente e encontramos associação com exacerbação pulmonar, mas sem associação para os outros desfechos. Selecionamos um *pool* com rinovírus subtipados (87) e outros vírus que não

rinovírus (64) e excluímos as amostras com rinovírus subtipo A e B (59) e a associação com exacerbação respiratória manteve-se presente. Poderíamos concluir que os subtipos A e B teriam um efeito protetor, mas é importante ressaltar que isso não foi encontrado (Tabela 10). De acordo com nossos resultados, seria muito interessante poder conhecer quais subtipos de rinovírus predominavam nos estudos onde houve alta detecção deles^{30,51,53}. Talvez diferenças epidemiológicas locais, com diferentes proporções de distribuição dos subtipos de rinovírus possa justificar o maior impacto que o rinovírus teve na casuística de Wat et al.⁵¹

Já são quase 30 anos que as primeiras pesquisas a respeito da importância das infecções virais respiratórias nos pacientes com FC foram publicadas, mas ainda restam muitas dúvidas a respeito da importância e do impacto dos vírus na FC. Grande parte se deve aos resultados conflitantes, assim como a grande variabilidade dos métodos diagnósticos empregados e, neste sentido, ousaria dizer que somente os estudos mais recentes apresentam possibilidades de resultados mais satisfatórios, uma vez que eles permitem a avaliação mais completa com a identificação de vírus antes não relatados. Entretanto ainda mesmos nestes trabalhos mais modernos já à luz de métodos de biologia molecular corretos com alta sensibilidade, um desenho de estudo inadequado, ou mesmo uma análise estatística inadequada para o estudo em questão, como vemos nos estudos de Smyth et al.⁴⁴ e Wat et al.⁵¹, pode apresentar resultados repletos de vieses.

O seguimento de todos pacientes com FC de até 18 anos do nosso Centro permitiu a identificação dos agentes virais não só na vigência de queixas respiratórias, mas também possibilitou a detecção de processos virais

assintomáticos, ou com sintomatologia mais frustra. Outro ponto a ser ressaltado é que ao completar 12 meses de coleta, ao invés de fazer a investigação somente nas estações de maior incidência viral como no estudo de van Ewijk et al.³⁰, pudemos avaliar a sazonalidade durante o período de um ano, fato interessante já que as nossas estações climáticas não são tão bem definidas como nos países de clima temperado.

No desenho do estudo todos os pacientes foram avaliados a cada consulta (agendada ou não), o que determinou que cada paciente passasse por quatro avaliações em média durante a pesquisa. Consideramos este número de consultas satisfatório, já que habitualmente as consultas ocorrem em cada dois a três meses. Se isso por um lado poderia dificultar a interpretação dos resultados, por outro lado permitiu exatamente o oposto pois exigiu o uso de métodos estatísticos mais sofisticados, onde há neutralização do viés que as repetições em um mesmo paciente poderiam ocasionar. O estudo de Wat et al.⁵¹, apresenta um desenho de estudo próximo ao nosso, onde 71 pacientes são seguidos por 17 meses, sendo avaliados em consultas de rotina e nas consultas extras, contabilizando uma média de duas consultas por paciente. A pesquisa conclui que o rinovírus é o vírus mais importante associado à exacerbação respiratória. Entretanto a análise estatística considera cada amostra isoladamente, deixando de especificar que um mesmo paciente representa até oito amostras da contagem total. Já na nossa pesquisa, com o uso de modelos de equação de estimação generalizados (EEG) com distribuição binomial, pudemos avaliar os dados considerando a repetição de amostras nos mesmos indivíduos.

Outra questão que precisa ser lembrada para uma adequada escolha da análise estatística é a persistência viral em amostras seqüenciais, que ocorreu neste estudo em 11 pacientes, oito destes por rinovírus. Este fato da persistência do RNA viral em amostras de secreção nasal já foi abordado por outros autores, alguns consideram a persistência do mesmo vírus por até duas semanas¹⁰⁰ enquanto outros valorizam a identificação viral até quatro a cinco semanas após a infecção inicial¹⁰¹. Certos autores descrevem essa questão da persistência viral do rinovírus^{53,102}, mas outros não relatam este achado^{30,51}.

A ausência de identificação de um número maior de agentes sabidamente mais agressivos nos pacientes com FC como VSR^{29,35,52} e o influenza⁵¹ pode ter colaborado para a falta de associação entre os diversos vírus identificados e os desfechos. Um dos fatores que pode explicar esta baixa detecção seria a idade da população em questão pois nesta casuística tínhamos somente três lactentes e isso provavelmente reduziu a detecção de VSR. Este fato pode decorrer da ausência de triagem neonatal rotineira no Estado de São Paulo, o que determina um diagnóstico mais tardio da doença. Outro dado importante é que pacientes com FC que seguem em nosso ambulatório, em algumas ocasiões foram hospitalizados em outros serviços, seja por morarem em outras cidades ou por disporem de sistema de saúde complementar, reduzindo o número de amostras coletadas nas exacerbações.

Em relação aos novos vírus pudemos investigar o bocavírus e os subtipos de rinovírus. Existem ainda poucos dados na literatura a respeito das infecções por estes agentes na faixa etária pediátrica e desconhecemos trabalhos em FC com a pesquisa destes agentes. Em relação ao bocavírus é descrito por Blessing et al.¹⁰³ a persistência dele em aspirado nasofaríngeo de

crianças imunocompetentes por até quatro meses e meio. Identificamos bocavírus em 23 amostras, em dois pacientes houve persistência da detecção após seis meses, negatizando em sete e oito meses após identificação inicial. Ainda não sabemos se tal achado é destituído de maiores repercussões, mas é essencial um melhor conhecimento destes novos agentes considerando-se a potencial gravidade do paciente em questão.

A predominância de *S. aureus* (68,6%) nas amostras de orofaringe e escarro refletem mais uma vez a faixa etária da população do estudo, onde a mediana de idade se encontra na faixa etária escolar e os pacientes mais jovens tendem a ter menor prevalência de colonização crônica por *P. aeruginosa*, observada em apenas 40% dos casos.

Uma das hipóteses desta pesquisa, com embasamento em pesquisas *in vitro*^{61,63,67}, é de que as infecções virais poderiam precipitar e facilitar a aquisição aguda e eventualmente até mesmo a colonização crônica por *Pseudomonas aeruginosa*. Petersen et al.²⁵ descreve a suspeita deste sinergismo pois constata elevação nos anticorpos antipseudomonas após infecções respiratórias virais em pacientes com FC. De um modo geral não houve associação das infecções virais com isolamento de bactérias mais relevantes para o paciente com FC em material representativo das vias aéreas, mas neste momento a sorologia para *P. aeruginosa* não foi realizada. Entretanto uma perspectiva futura diz respeito ao soro congelado destes pacientes, quando poderemos procurar associações entre as infecções virais com os resultados da sorologia para *P. aeruginosa*. Avaliando a repercussão bacteriológica das infecções virais, da mesma forma que no presente estudo sem empregar sorologias, os estudos de Olesen et al.⁵³ e Wat et al.⁵¹ também

não encontram diferença na colonização bacteriana ou no isolamento de *P. aeruginosa* associado a infecção viral.

A pesquisa deste amplo painel de vírus respiratórios, de forma longitudinal e prospectiva, da totalidade de pacientes com FC, com uso de métodos diagnósticos de alta sensibilidade como o que foi empregado neste estudo é mais uma linha de pesquisa de ponta desenvolvida pela Unidade de Pneumologia Pediátrica do Instituto da Criança do HCFMUSP. Conseguimos cumprir a nossa meta, pois estimávamos um número total de coletas muito próximo ao que foi obtido. A identificação maciça dos agentes virais, dentre os quais se destacam os novos vírus (bocavírus e subtipos A2 e C do rinovírus) nunca descritos em paciente com FC mostra a importância de um estudo como este.

Os pacientes com FC já recebem diariamente uma grande variedade de fármacos e é imprescindível que o uso de medicações seja extremamente criterioso. É indiscutível o avanço em relação às novas drogas anti-virais e, à exceção da prevenção contra a influenza sazonal⁷⁴ e tratamento específico contra infecções pelo influenza vírus, ainda não existe consenso em relação a prevenção e tratamento para os outros vírus respiratórios¹⁰⁴.

O conhecimento aprofundado e específico de mais fatores que possam interferir na história natural da doença poderá permitir a inclusão cada vez mais apropriada de novas condutas, terapêuticas e profiláticas, em relação às infecções respiratórias virais. Entretanto, sem estudos como este, seria impossível diagnosticar e determinar precisamente quais vírus tem impacto relevante ou não.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A identificação de um vírus respiratório ocorreu em 49,8% das amostras dos pacientes com fibrose cística durante o período de um ano, sendo o rinovírus o principal agente identificado.
- A imunofluorescência identificou quatro das 24 possíveis identificações virais por este método.
- A identificação de vírus respiratórios não se associou com a ocorrência de exacerbação ou internação hospitalar. Entretanto, a identificação do vírus influenza A associou-se com maior risco de hospitalização.
- O rinovírus foi identificado em um grande número de pacientes estáveis (34%) e, excluindo-se este agente da análise, houve associação entre a identificação de outros vírus respiratórios e a ocorrência de exacerbação da doença pulmonar.
- Entretanto, analisando-se os subtipos de rinovírus encontrados, observamos significativo risco de exacerbação pulmonar associado à identificação dos subtipos A2 ou C.
- Não foi evidenciada associação entre infecção viral e piora funcional, tanto na espirometria como na oximetria de pulso.
- Não foi identificada associação entre a detecção de algum vírus e o isolamento de bactérias patogênicas para os pacientes com Fibrose cística, como *P. aeruginosa*, *S. aureus*, complexo *B. cepacia* e *S. maltophilia*.

7. Anexos

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09.11.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **925/05**, intitulado: "Avaliação das infecções respiratórias virais em pacientes com fibrose cística" apresentado pelo Departamento de **PEDIATRIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Dr. Luiz Vicente R. Ferreira da Silva Filho**

Pesquisador (a) Executante: **Dr. Cláudio Sérgio Pannuti**

CAPPesq, 09 de Novembro de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo B - Folheto explicativo fornecido aos pais (responsáveis) durante apresentação do estudo.

PROJETO DE PESQUISA NO INSTITUTO DA CRIANÇA
VÍRUS RESPIRATÓRIOS NA FIBROSE CÍSTICA

UNIDADE DE PNEUMOLOGIA PEDIÁTRICA

PORQUE ESTÃO FAZENDO ESTA PESQUISA?

Os VÍRUS RESPIRATÓRIOS são uma causa comum de problemas respiratórios em crianças, e possivelmente estão envolvidos nos episódios de piora da doença pulmonar em pacientes com fibrose cística. Vários novos vírus estão sendo descobertos, e pouco se conhece sobre seu impacto em pacientes com fibrose cística.

Esta pesquisa pretende estudar as infecções respiratórias por vírus (11 tipos diferentes) que acometem pacientes com fibrose cística, seus efeitos imediatos e tardios.

COMO VAI SER FEITA A PESQUISA?

Todos os pacientes com fibrose cística serão convidados a participar do estudo. Inicialmente um dos membros da equipe pedirá autorização para os pais e/ou responsáveis e explicará em detalhes tudo o que vai ser feito: coletas de sangue no início e ao término do estudo (1 ano), teste de função pulmonar, oximetria de pulso e coletas de lavado nasal e escarro (ou orofaringe) em todas as consultas, além de atendimento e exame médico do paciente. Todos estes procedimentos serão feitos por ocasião das consultas habituais, sem necessidade de comparecimento ao Hospital por motivo relacionado à Pesquisa. Os exames de escarro (ou orofaringe) não substituirão os exames regularmente colhidos no Hospital como parte do seguimento médico dos pacientes com fibrose cística.

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") ou ainda através da colocação de soro fisiológico no nariz e uma assoada forte em um recipiente plástico.

O QUE VAI SER FEITO COM O LAVADO NASAL?

A detecção dos vírus respiratórios, outros microrganismos será feita 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?

Esta pesquisa está sendo financiada pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), e portanto estes exames serão realizados sem nenhum custo para o SUS, familiares ou fontes pagadoras (convênios ou seguros de saúde).

É importante ressaltar, entretanto, que a pesquisa está restrita aos procedimentos listados acima. 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) decidirá por 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?

Todos os pacientes serão convidados a participar do estudo, e a qualquer momento podem também deixar de participar, se assim o desejarem.

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 participantes).

Responsáveis:

Dr. Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho
Dra. Marina Buarque de Almeida
Dra. Fabíola Villac Adde
Dr. Joaquim Carlos Rodrigues

Tels. 3069-8566 / 3069-8538
BIP: 3444 4545 - código 16457

Anexo C – Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
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 :
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE :
- CEP: TELEFONE: DDD(.....)
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: “Avaliação das Infecções Respiratórias Virais em Pacientes com Fibrose Cística”.
- PESQUISADOR: **Dr. Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho**
- CARGO/FUNÇÃO: **MÉDICO** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **69.437**
- UNIDADE DO HCFMUSP: **INSTITUTO DA CRIANÇA**
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 - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE
OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA,
CONSIGNANDO:**

Trata-se de uma pesquisa para tentar conhecer melhor as infecções causadas por vírus nas crianças com mucoviscidose. Pretende-se estudar, durante um ano, os episódios de infecção por vírus e suas consequências para os pacientes, como necessidade de antibióticos, aparecimento de novas bactérias e piora da função pulmonar. Para tanto, os pacientes farão uma medida da oxigenação através de um aparelho que é colocado no dedo (oxímetro de pulso) e também a medida da função pulmonar (crianças acima de 6 anos), que é o exame de assoprar que é feito rotineiramente durante seu seguimento no ambulatório. Além disso, serão colhidas amostras de escarro ou de esfregaço da garganta (que você está habituado(a) a colher) e um lavado nasal, 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”). Serão colhidas ainda amostras de sangue no início e no fim do estudo. Estas amostras servirão para verificar se existe reação do organismo à presença das bactérias e vírus encontrados durante a pesquisa. Os exames e coletas de amostras serão feitos no próprio ambulatório e no dia de atendimento, mas não substituirão as amostras colhidas rotineiramente, pois serão estudadas em outro laboratório, somente com fins de pesquisa.

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, escarro ou esfregaço de garganta, o risco de provocar o vômito durante a coleta.

As coletas de sangue também apresentam o risco **mínimo** de trazer desconforto durante sua realização e provocar o aparecimento de pequeno inchaço ou mancha roxa no local da picada.

As condutas necessárias a estes procedimentos bem como as intercorrências previsíveis (vômito, dor durante a punção, inchaço no local) 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 tratamento nas dependências do Instituto da Criança.

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 DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dr. Luiz Vicente Ferreira da Silva Filho – médico assistente da Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança

Tel. 3069-8537 / 3069-8538 / 3069-8566

Bip: 3444-4545 código 95990

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

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)

Anexo D – Protocolo clínico**ETIQUETA DO PACIENTE**

--	--

DATA: ____ / ____ / ____**COLETA Nº** _____**PROJETO DE PESQUISA: AVALIAÇÃO DAS INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS VIRAIS EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA****AMOSTRA COLHIDA:** ☐ ESCARRO ☐ SWAB OROFARINGE**DADOS CLÍNICOS:****COMO ESTÁ DESDE A ÚLTIMA CONSULTA (NÃO PREENCHER NA 1ª CONSULTA):**

A criança está bem? ☐ SIM ☐ NÃO ☐ óbito: data _____			
Precisou voltar ao Pronto Socorro? ☐ NÃO ☐ SIM			
Quantas vezes por causa respiratória? ☐ 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			
Usou algum antibiótico? ☐ NÃO ☐ SIM N° de vezes: _____			
Qual(is)? _____ ☐ NÃO SEI			
Desde a última consulta, quantos dias de trabalho você perdeu por causa dos problemas respiratórios do seu filho(a)?			
☐ nenhum ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ >5 ☐ não trabalha			
Desde a última consulta (nos últimos 2 meses), quantos dias de berçário/escola seu filho(a) perdeu por causa de problemas respiratórios?			
☐ nenhum ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ >5 ☐ não frequenta			

RELACIONAR OS SINTOMAS DOS ÚLTIMOS 5 DIAS:

Coriza	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Obstrução nasal	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Presença de Febre	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI Temp máx.: _____°C
Dor de garganta	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Dores no corpo	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Tosse seca	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Tosse com catarro	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Chiado	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Diarréia	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Coriza	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Aumento da quanti/e de secreção e/ou intensidade da tosse ☐ NÃO ☐ SIM ☐ NÃO SEI			
Mudança de aspecto da secreção	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Piora do cansaço ou falta de ar	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Cianose	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Inapetência, vômitos pós tosse	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI
Perda de peso recente (uso de enzimas OK)	☐ NÃO	☐ SIM	☐ NÃO SEI

USO DE MEDICAÇÕES POR VIA INALATÓRIA (NOS ÚLTIMOS 3 DIAS):

Pulmozyme® ☐ Fluimucil® ☐
 Garamicina® ☐ Tobramicina® ☐ Colistin® ☐ Outras ☐ _____

USO DE ANTIBIÓTICOS (ÚLTIMA SEMANA):

☐ NÃO☐ SIM QUAL: _____ ÚLTIMA DOSE: _____

DADOS DE EXAME FÍSICO:

Peso: _____ Kg (p _____)	
Estatura: _____ cm (p _____)	
Temperatura _____ °C	
Estado geral: ☐ Bom ☐ Regular ☐ Ruim ☐ Tranquilo ☐ Agitado ☐ Prostrado	
Exantema: ☐ NÃO ☐ SIM	
Conjuntivite? ☐ SIM ☐ NÃO	
Faringe e Amígdala: ☐ Normal ☐ Hiperemia ☐ Exsudato Purulento ☐ Hipertrofia ☐ Petéquias ☐ Vesículas/Ulcerações	
Otosopia D: ☐ Normal ☐ Hiperemia com brilho ☐ Hiperemia sem brilho ☐ Coleção/Abaulamento ☐ Opacidade sem hiperemia ☐ Perfuração/Otorréia	
Otosopia 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.): _____	
Cianose? ☐ SIM ☐ NÃO	
Gemência? ☐ SIM ☐ NÃO	
Presença de estridor: ☐ SIM ☐ NÃO	
Tiragens: ☐ Intercostal ☐ Subcostal ☐ Fúrcula ☐ Batimento asa nasal	
Sibilos: ☐ SIM ☐ NÃO	
Roncos: ☐ SIM ☐ NÃO	
Estertores finos: ☐ SIM ☐ NÃO Se SIM: ☐ Difusos ☐ Localizados	
Último Escore de Schwachman: _____ data: ____/____/____	
FUNÇÃO PULMONAR Última função pulmonar DATA: ☐ HOJE ☐ Não fez Paciente menor de 6 anos ☐ CVF= _____ litros (_____ pred) CVF= _____ litros (_____ %pred) VEF1= _____ litros (_____ %pred) VEF1= _____ litros (_____ %pred) Tiff= _____ % Tiff= _____ %	
Oximetria de pulso – última medida: _____ valor médio atual: _____	

EXACERBAÇÃO DA DOENÇA RESPIRATÓRIA:

☐ SIM☐ NÃO

CONDUTA NA CONSULTA ATUAL:

ANTIBIÓTICOS:

☐ NÃO☐ SIM QUAL(IS): _____

INTERNAÇÃO:

☐ NÃO ☐ SIM

COLETA DE SANGUE:

☐ NÃO ☐ SIM☐ AMOSTRA 1 ☐ AMOSTRA 2

Anexo E – Escore de Shwachman-Kulczycki

Escore de Shwachman-Kulczycki (77)					
	Ponto	Atividade	Exame físico	Nutrição	Radiografia
Excelente 86-100	25	Atividade íntegra, joga, brinca, vai à escola regularmente.	Normal. Não tosse, FC e FR normais. Pulmões livres. Boa postura.	Peso e altura acima do percentil 25. Fezes bem formadas. Boa musculatura e tônus.	Campos pulmonares limpos.
Bom 71-85	20	Irritabilidade e cansaço no fim do dia. Boa frequência escolar.	FC e FR normais em repouso. Tosse rara. Pulmões livres. Pouco enfisema.	Peso e altura entre percentis 15-20. Fezes discretamente alteradas.	Pequena acentuação da trama vasobrônquica. Enfisema discreto.
Médio 56-70	15	Necessita repousar durante o dia. Cansaço fácil após exercícios. Diminui frequência a escola.	Tosse ocasional, às vezes de manhã. FR levemente aumentada. Médio enfisema. Discreto baqueteamento digital.	Peso e altura acima do terceiro percentil. Fezes anormais, pouco formadas. Distensão abdominal. Hipotrofia muscular.	Enfisema de média intensidade. Aumento da trama vasobrônquica.
Moderado 41-55	10	Dispneia após pequenas caminhadas. Repouso em grande parte do dia.	Tosse recorrente produtiva, retração torácica. Enfisema moderado, pode ter deformidade de tórax. Baqueteamento 2 a 3.	Peso e altura abaixo do terceiro percentil. Fezes anormais. Volumosa redução da massa muscular.	Moderado enfisema. Áreas de atelectasia. Áreas de infecção discreta. Bronquiectasias.
Grave ≤ 40	5	Ortopnéia. Confinado ao leito.	Tosse intensa. Períodos de taquipnéia e taquicardia e extensas alterações pulmonares. Pode mostrar sinais de falência cardíaca direita. Baqueteamento 3 a 4.	Desnutrição intensa. Distensão abdominal, prolapso retal.	Extensas alterações. Fenômenos obstrutivos. Infecção, atelectasias, bronquiectasias.

7. Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cystic Fibrosis Foundation. *Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Report 2006*. Bethesda, Maryland, USA; 2007 [serial on the Internet]. 2007. www.cff.org
2. Cystic Fibrosis Foundation. *Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Report 2007*. Bethesda, Maryland, USA; 2008 [serial on the Internet]. 2008. www.cff.org
3. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, et al. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med*. 1994;331(10):637-42.
4. Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1997;23(5):330-5.
5. Jaffe A, Francis J, Rosenthal M, Bush A. Long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. *Lancet*. 1998;351(9100):420.
6. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J, et al. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. *N Engl J Med*. 1999;340(1):23-30.
7. Doull IJ. Recent advances in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 2001;85(1):62-6.

8. Farrell PM, Kosorok MR, Rock MJ, Laxova A, Zeng L, Lai HC, et al. Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *Pediatrics*. 2001;107(1):1-13.
9. Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA, et al. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;290(13):1749-56.
10. Taccetti G, Campana S, Festini F, Mascherini M, Doring G. Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*. 2005;26(3):458-61.
11. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066-73.
12. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073-80.
13. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 1989;245(4922):1059-65.
14. Tsui LC. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(3 Pt 2):S47-53.

-
15. Raskin S, Pereira-Ferrari L, Reis FC, Abreu F, Marostica P, Rozov T, et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros*. 2008;7(1):15-22.
 16. Accurso FJ, Sokol RJ, Hammond KB, Abman SH. Early respiratory course in infants with cystic fibrosis: relevance to newborn screening. *Pediatr Pulmonol Suppl*. 1991;7:42-5.
 17. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Gutierrez JP, Hull J, et al. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(4 Pt 1):1197-204.
 18. Heijerman H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. *J Cyst Fibros*. 2005;4 Suppl 2:3-5.
 19. Robinson M, Bye PT. Mucociliary clearance in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002;33(4):293-306.
 20. Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W, Ahrens R, Fick R. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1995;20(2):63-70.
 21. Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Robertson CF, et al. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2001;138(5):699-704.

22. Kosorok MR, Zeng L, West SE, Rock MJ, Splaingard ML, Laxova A, et al. Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *Pediatr Pulmonol*. 2001;32(4):277-87.
23. Goss CH, Burns JL. Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax*. 2007;62(4):360-7.
24. Flume PA, Mogayzel PJ, Jr., Robinson KA, Goss CH, Rosenblatt RL, Kuhn RJ, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: treatment of pulmonary exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(9):802-8.
25. Petersen NT, Hoiby N, Mordhorst CH, Lind K, Flensburg EW, Bruun B. Respiratory infections in cystic fibrosis patients caused by virus, chlamydia and mycoplasma--possible synergism with *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Paediatr Scand*. 1981;70(5):623-8.
26. Armstrong D, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Hull J, Olinsky A, et al. Severe viral respiratory infections in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1998;26(6):371-9.
27. Clifton IJ, Kastelik JA, Peckham DG, Hale A, Denton M, Etherington C, et al. Ten years of viral and non-bacterial serology in adults with cystic fibrosis. *Epidemiol Infect*. 2008;136(1):128-34.
28. Ramsey BW, Gore EJ, Smith AL, Cooney MK, Redding GJ, Foy H. The effect of respiratory viral infections on patients with cystic fibrosis. *Am J Dis Child*. 1989;143(6):662-8.

-
29. Hiatt PW, Grace SC, Kozinetz CA, Raboudi SH, Treece DG, Taber LH, et al. Effects of viral lower respiratory tract infection on lung function in infants with cystic fibrosis. *Pediatrics*. 1999;103(3):619-26.
30. van Ewijk BE, van der Zalm MM, Wolfs TF, Fleer A, Kimpen JL, Wilbrink B, et al. Prevalence and impact of respiratory viral infections in young children with cystic fibrosis: prospective cohort study. *Pediatrics*. 2008;122(6):1171-6.
31. Wong JY, Rutman A, O'Callaghan C. Recovery of the ciliated epithelium following acute bronchiolitis in infancy. *Thorax*. 2005;60(7):582-7.
32. Wat D, Doull I. Respiratory virus infections in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2003;4(3):172-7.
33. Conway SP, Simmonds EJ, Littlewood JM. Acute severe deterioration in cystic fibrosis associated with influenza A virus infection. *Thorax*. 1992;47(2):112-4.
34. Collinson J, Nicholson KG, Cancio E, Ashman J, Ireland DC, Hammersley V, et al. Effects of upper respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 1996;51(11):1115-22.
35. Abman SH, Ogle JW, Butler-Simon N, Rumack CM, Accurso FJ. Role of respiratory syncytial virus in early hospitalizations for respiratory distress of young infants with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 1988;113(5):826-30.
36. van Ewijk BE, van der Zalm MM, Wolfs TF, van der Ent CK. Viral respiratory infections in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2005;4 Suppl 2:31-6.
37. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ*. 1993;307(6910):982-6.

-
38. Gern JE, Busse WW. Association of rhinovirus infections with asthma. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1):9-18.
39. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, O'Toole S, Myint SH, Tyrrel DAJ, Holgate ST. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ.* 1995;310(6989):1225-9.
40. Tan WC, Xiang X, Qiu D, Ng TP, Lam SF, Hegele RG. Epidemiology of respiratory viruses in patients hospitalized with near-fatal asthma, acute exacerbations of asthma, or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med.* 2003;115(4):272-7.
41. Grissell TV, Powell H, Shafren DR, Boyle MJ, Hensley MJ, Jones PD, et al. Interleukin-10 gene expression in acute virus-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(4):433-9.
42. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(9):1618-23.
43. Rohde G, Wiethage A, Borg I, Kauth M, Bauer TT, Gillissen A, et al. Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax.* 2003;58(1):37-42.
44. Smyth AR, Smyth RL, Tong CY, Hart CA, Heaf DP. Effect of respiratory virus infections including rhinovirus on clinical status in cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 1995;73(2):117-20.

-
45. Zheng S, De BP, Choudhary S, Comhair SA, Goggans T, Slee R, et al. Impaired innate host defense causes susceptibility to respiratory virus infections in cystic fibrosis. *Immunity*. 2003;18(5):619-30.
46. Colasurdo GN, Fullmer JJ, Elidemir O, Atkins C, Khan AM, Stark JM. Respiratory syncytial virus infection in a murine model of cystic fibrosis. *J Med Virol*. 2006;78(5):651-8.
47. Wang EE, Prober CG, Manson B, Corey M, Levison H. Association of respiratory viral infections with pulmonary deterioration in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1984;311(26):1653-8.
48. Punch G, Syrmis MW, Rose BR, Harbour C, Bye PT, Nissen MD, et al. Method for detection of respiratory viruses in the sputa of patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(1):54-7.
49. Hordvik NL, Konig P, Hamory B, Cooperstock M, Kreutz C, Gayer D, et al. Effects of acute viral respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1989;7(4):217-22.
50. Pribble CG, Black PG, Bosso JA, Turner RB. Clinical manifestations of exacerbations of cystic fibrosis associated with nonbacterial infections. *J Pediatr*. 1990;117(2 Pt 1):200-4.
51. Wat D, Gelder C, Hibbitts S, Cafferty F, Bowler I, Pierrepont M, et al. The role of respiratory viruses in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2008;7(4):320-8.

-
52. Garcia DF, Hiatt PW, Jewell A, Schoonover SL, Cron SG, Riggs M, et al. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus infections in older children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2007;42(1):66-74.
53. Olesen HV, Nielsen LP, Schiotz PO. Viral and atypical bacterial infections in the outpatient pediatric cystic fibrosis clinic. *Pediatr Pulmonol*. 2006;41(12):1197-204.
54. Henrickson KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(1 Suppl):S6-10.
55. 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.
56. 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;189(4):706-10.
57. Fan J, Henrickson KJ, Savatski LL. Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and B, influenza viruses A and B, and human parainfluenza virus types 1, 2, and 3 by multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridization assay (Hexaplex). *Clin Infect Dis*. 1998;26(6):1397-402.
58. Erdman DD, Weinberg GA, Edwards KM, Walker FJ, Anderson BC, Winter J, et al. GeneScan reverse transcription-PCR assay for detection of six common

respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4298-303.

59. Thomazelli LM. *Vigilância epidemiológica de vírus respiratórios humanos em amostras clínicas pela técnica de genescan-RT-PCR*. [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2004.

60. 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.

61. Ramirez-Ronda CH, Fuxench-Lopez Z, Nevarez M. Increased pharyngeal bacterial colonization during viral illness. *Arch Intern Med*. 1981;141(12):1599-603.

62. Hament JM, Kimpen JL, Flier A, Wolfs TF. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;26(3-4):189-95.

63. Van Ewijk BE, Wolfs TF, Aerts PC, Van Kessel KP, Flier A, Kimpen JL, et al. RSV mediates *Pseudomonas aeruginosa* binding to cystic fibrosis and normal epithelial cells. *Pediatr Res*. 2007;61(4):398-403.

64. Stark JM, Stark MA, Colasurdo GN, LeVine AM. Decreased bacterial clearance from the lungs of mice following primary respiratory syncytial virus infection. *J Med Virol*. 2006;78(6):829-38.

65. Oliver BG, Lim S, Wark P, Laza-Stanca V, King N, Black JL, et al. Rhinovirus exposure impairs immune responses to bacterial products in human alveolar macrophages. *Thorax*. 2008;63(6):519-25.

-
66. Johansen HK, Hoiby N. Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark. *Thorax*. 1992;47(2):109-11.
67. de Vrankrijker AM, Wolfs TF, Ciofu O, Hoiby N, van der Ent CK, Poulsen SS, et al. Respiratory syncytial virus infection facilitates acute colonization of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *J Med Virol*. 2009;81(12):2096-103.
68. da Silva Filho LV, Levi JE, Oda Bento CN, da Silva Ramos SR, Rozov T. PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol*. 1999;48(4):357-61.
69. da Silva Filho LV, Levi JE, Bento CN, Rodrigues JC, da Silva Ramos SR. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis outpatient clinic. *J Med Microbiol*. 2001;50(3):261-7.
70. da Silva Filho LV, Tateno AF, Velloso Lde F, Levi JE, Fernandes S, Bento CN, et al. Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR. *Pediatr Pulmonol*. 2004;37(6):537-47.
71. da Silva Filho LV, Tateno AF, Martins KM, Azzuz Chernishev AC, Garcia Dde O, Haug M, et al. The combination of PCR and serology increases the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2007;42(10):938-44.
72. Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus AD, Trottier S, Carewicz O, Mercier CH, et al. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised

controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. *Lancet*. 2000;355(9218):1845-50.

73. Giebels K, Marcotte JE, Podoba J, Rousseau C, Denis MH, Fauvel V, et al. Prophylaxis against respiratory syncytial virus in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2008;43(2):169-74.

74. Wat D, Gelder C, Hibbitts S, Bowler I, Pierrepont M, Evans R, et al. Is there a role for influenza vaccination in cystic fibrosis? *J Cyst Fibros*. 2008;7(1):85-8.

75. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*. 1998;132(4):589-95.

76. Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ, Jr., Willey-Courand DB, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(10):957-69.

77. Shwachman H, Kulczycki LL, Khaw KT. A report on sixty-five patients over 17 years of age. *Pediatrics*. 1965;36(5):689-99.

78. Rodrigues JC, Cardieri JMA, Bussamra MH, Nakaie CM, Almeida MB, Silva Filho LVF, et al. Provas de função pulmonar em crianças e adolescentes. *Jornal de Pneumologia*. 2002;28(supl 3):S207-S21.

79. Polgar G, Weng TR. The functional development of the respiratory system from the period of gestation to adulthood. *Am Rev Respir Dis*. 1979;120(3):625-95.

-
80. Knudson RJ, Lebowitz MD, Holberg CJ, Burrows B. Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis*. 1983;127(6):725-34.
81. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J*. 2005;26(5):948-68.
82. Lambert SB, Whiley DM, O'Neill NT, Andrews EC, Canavan FM, Bletchly C, et al. Comparing nose-throat swabs and nasopharyngeal aspirates collected from children with symptoms for respiratory virus identification using real-time polymerase chain reaction. *Pediatrics*. 2008;122(3):e615-20.
83. O'Shea MK, Cane PA. Development of a highly sensitive semi-quantitative real-time PCR and molecular beacon probe assay for the detection of respiratory syncytial virus. *J Virol Methods*. 2004;118(2):101-10.
84. Echevarria JE, Erdman DD, Swierkosz EM, Holloway BP, Anderson LJ. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 1998;36(5):1388-91.
85. Claas EC, Sprenger MJ, Kleter GE, van Beek R, Quint WG, Masurel N. Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 1992;39(1-2):1-13.
86. 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.

-
87. Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis*. 2003;187(5):785-90.
88. Papadopoulos NG, Hunter J, Sanderson G, Meyer J, Johnston SL. Rhinovirus identification by BglI digestion of picornavirus RT-PCR amplicons. *J Virol Methods*. 1999;80(2):179-85.
89. 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;122(1):29-36.
90. 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;102(36):12891-6.
91. Mathieu V, Mijatovic T, van Damme M, Kiss R. Gastrin exerts pleiotropic effects on human melanoma cell biology. *Neoplasia*. 2005;7(10):930-43.
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. Calvo C, Garcia ML, Pozo F, Reyes N, Perez-Brena P, Casas I. Role of rhinovirus C in apparently life-threatening events in infants, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(9):1506-8.

-
94. Peltola V, Waris M, Osterback R, Susi P, Ruuskanen O, Hyypia T. Rhinovirus transmission within families with children: incidence of symptomatic and asymptomatic infections. *J Infect Dis*. 2008;197(3):382-9.
95. Lee WM, Kiesner C, Pappas T, Lee I, Grindle K, Jartti T, et al. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS One*. 2007;2(10):e966.
96. Lau SK, Yip CC, Tsoi HW, Lee RA, So LY, Lau YL, et al. Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. *J Clin Microbiol*. 2007;45(11):3655-64.
97. Kistler A, Avila PC, Rouskin S, Wang D, Ward T, Yagi S, et al. Pan-viral screening of respiratory tract infections in adults with and without asthma reveals unexpected human coronavirus and human rhinovirus diversity. *J Infect Dis*. 2007;196(6):817-25.
98. 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;165(9):1285-9.
99. 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.

100. Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Koskenvuo M, Ruuskanen O. Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *J Med Virol.* 2004;72(4):695-9.
101. Winther B, Hayden FG, Hendley JO. Picornavirus infections in children diagnosed by RT-PCR during longitudinal surveillance with weekly sampling: Association with symptomatic illness and effect of season. *J Med Virol.* 2006;78(5):644-50.
102. van Bente I, Koopman L, Niesters B, Hop W, van Middelkoop B, de Waal L, et al. Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatr Allergy Immunol.* 2003;14(5):363-70.
103. Blessing K, Neske F, Herre U, Kreth HW, Weissbrich B. Prolonged detection of human bocavirus DNA in nasopharyngeal aspirates of children with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(11):1018-9.
104. Speer ME, Fernandes CJ, Boron M, Groothuis JR. Use of Palivizumab for prevention of hospitalization as a result of respiratory syncytial virus in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(6):559-61.