

Milena De Paulis

Análise da relação entre carga viral do vírus sincicial respiratório e rinovírus e gravidade clínica na infecção aguda de vias aéreas inferiores em lactentes hospitalizados

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Elisabete Vieira

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Paulis, Milena De
Análise da relação entre carga viral do vírus
sincicial respiratório e rinovírus e gravidade clínica
na infecção aguda de vias aéreas inferiores em
lactentes hospitalizados / Milena De Paulis. -- São
Paulo, 2020.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Sandra Elisabete Vieira.

Descritores: 1.Bronquiolite 2.Rhinovirus
3.Infecções por vírus respiratório sincicial
4.Coinfecção 5.Carga viral 6.Índice de gravidade de
doença

USP/FM/DBD-240/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

A Deus, por me escolher e capacitar para a missão de cuidar das crianças e de todos os envolvidos no seu amor e cuidado.

À minha mãe Lucia, meu pai Remo e meu irmão Fabrizio.

Agradecimentos

Com o término do doutorado, conquisto uma responsabilidade científica e de ensino. Por isso quero agradecer:

Aos meus amigos do HU-USP, residentes e internos que são o estímulo para a minha vida acadêmica

À equipe de enfermagem do PSI-HU, amigas e companheiras sempre solícitas durante todo o meu processo de pesquisa

À equipe do SAME HU-USP, em especial ao Eduardo, sempre prestativo e dedicado em atender às minhas solicitações

À equipe do Prof. Edison Luiz Durigon, pelo processamento das amostras, e em especial ao Luciano Matsumiya Thomazelli

À minha querida amiga Camila Sanches Lanetzki Esposito

À Profa. Dra. Sandra Elisabete Vieira, pelos seus ensinamentos e orientação durante todo o processo de desenvolvimento da tese

“A ciência é o amor que investiga”

André Luiz

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de Símbolos	
Lista de Siglas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Gráficos	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Características estruturais e clínicas do VSR	2
1.1.1. Características estruturais do VSR	2
1.1.2. Epidemiologia do VSR	4
1.1.3. Características clínicas do VSR	4
1.2. Características estruturais e clínicas do RV	6
1.2.1. Características estruturais do RV	6
1.2.2. Epidemiologia do RV	7
1.2.3. Características clínicas do RV	7
1.3. Métodos de identificação viral	8
1.3.1. Codetecção viral pelos métodos moleculares	9
1.3.2. Identificação viral quantitativa por PCR (qPCR).....	9
1.4. Associação da carga viral com a gravidade da bronquiolite	10
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	13
3. HIPÓTESE	15
4. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo geral	17
4.2. Objetivos específicos	17
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	19
5.1. Considerações Éticas	19
5.2. Casuística	19
5.3. Delineamento do Estudo	20
5.4. Análises do material biológico	22
5.4.1. Amostras de secreção respiratória de aspirado de nasofaringe...	22
5.4.2. Extração do RNA/DNA total de amostras de aspirado de nasofaringe.....	22

5.4.3. Detecção do VSR e RV por RT-PCR em Tempo Real (qPCR) one-step	23
5.5. Análise Estatística.....	24
5.5.1. Cálculo da amostra.....	26
6. RESULTADOS	28
6.1. Análises descritivas e comparativas dos grupos segundo a etiologia.	30
6.2. Grupos virais e categorias de gravidade segundo o escore clínico	33
6.3. Análise das cargas virais segundo os grupos etiológicos.....	33
6.4. Análise do tempo decorrido entre o início dos sintomas e a coleta da secreção de nasofaringe.....	34
6.5. Análise das associações entre cargas virais e desfechos de gravidade.....	36
6.5.1. Infecção isolada por VSR	36
6.5.2. Infecção isolada por RV.....	36
6.5.3. Codetecção VSR com RV.....	36
7. DISCUSSÃO	39
7.1. Limitações do estudo	47
8. CONCLUSÕES	49
9. ANEXOS	52
Anexo A.....	52
Anexo B.....	55
Anexo C.....	56
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE SÍMBOLOS

IC	Intervalo de confiança
μL	microlitro
mM	milimolar
ml	Mililitro
N	População da amostra
n	tamanho da amostra
pMol	Picomol
U	Unidade

LISTA DE SIGLAS

BA	Bronquiolite aguda
BIPAP	Bilevel Positive Pressure Airway
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CCL5	Ligante 5 de quimiocina CC
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CDHR3	proteína membro da família 3 relacionado com caderina
CEP	Comissão de Ética e Pesquisa
CIV	Comunicação interventricular
COVID-19	Coronavirus disease 19
CPAP	Continuous positive airway pressure
Ct	Cycle treshold
CXCL10	ligante 10 de quimiocina com motivo C-X-C
DATASUS	Departamento de informática do sistema único de saúde do Brasil
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DP	Desvio padrão
et al	Et alii
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação do Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
HU-USP	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
IC	Imunocromatografia
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular – 1

ICB II	Instituto de Ciências Biomédicas II
IFD	Imunofluorescência direta
IL	Interleucina
INF	Interferon
IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
LDLR	receptor de lipoproteína de baixa densidade
Log ₁₀ cópias/ml	Logaritmo na base 10 de cópias/mililitro
Máx	Máximo
Min	Mínimo
NS1	Proteína não estrutural 1 do VSR
NS2	Proteína não estrutural 2 do VSR
O2	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEG	Pesquisa de expressão gênica
PFU	Unidade formadora de placa (<i>plaque-forming unit</i>)
PSI	Pronto Socorro Infantil
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted
RNA	Ácido ribonucléico
RNP	Ribonucleoproteína
RT-PCR	Transcrição reversa da reação em cadeia de polimerase
RT-qPCR	Transcrição reversa da reação em cadeia de polimerase quantitativa
RV	Rinovírus

RV A	Rinovírus A
RV B	Rinovírus B
RV C	Rinovírus C
SaO2	Saturação arterial de oxigênio
SH	Proteína hidrofóbica de superfície do VSR
SISNEP	Sistema Nacional de Informações sobre Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th 1	Linfócito T helper 1
Th 2	Linfócito T helper 2
TL	Tampão de lise
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris-HCL	Trishidroximetilaminometano ácido clorídrico
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTR	Região não traduzida do RV
VSR	Vírus sincicial respiratório
VSR A	Vírus sincicial respiratório A
VSR B	Vírus sincicial respiratório B
VSR BA	Genótipo Buenos Aires do vírus sincicial respiratório
VSR NA1	Genótipo Niigata 1 do vírus sincicial respiratório
VSR ON1	Genótipo Ontário 1 do vírus sincicial respiratório

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo representativo do vírus sincicial respiratório com as glicoproteínas de superfície (G, F e SH), proteínas associadas ao genoma RNA (L, N e P), proteínas não estruturais (NS1 e NS2), fatores de transcrição e replicação do RNA (M2-1 e M2-2)) e a matriz M	3
Figura 2 - Estrutura do capsídeo do Rinovírus com suas proteínas VP1 (em azul), VP2 (em verde), VP3 (em vermelho) e VP4 no interior (não visualizada).....	6
Figura 3 - Estrutura genômica do RV constituída pela região não traduzida (UTR) na extremidade 5' e início do genoma com o pequeno peptídeo VPg. A proteína P1 forma o capsídeo do RV, P2 e P3 produzem a VPg, protease e a polimerase RNA dependente (RDRP)	7
Figura 4 - Relação entre o cycle threshold, linha de intersecção (em verde) e intensidade da emissão do corante fluorescente durante a reação do qPCR ou qRT-PCR nas amostras de nasofaringe contendo vírus respiratórios.....	10
Figura 5 - Esquematização do delineamento do estudo	21
Figura 6 - Distribuição dos vírus encontrados nas amostras de aspirado de secreção nasofaríngea no estudo matriz.....	28
Figura 7 - Característica das amostras incluídas no estudo	29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Conjunto de Primers e sondas utilizados para transcrição reversa e amplificação simultânea (one-step PCR em tempo real) de VSR e RV24
- Tabela 2** - Análises descritivas e comparativas das características demográficas e antecedentes dos pacientes incluídos entre os grupos infecção isolada por VSR e RV e codeteção entre ambos os vírus31
- Tabela 3** - Desfechos de gravidade segundo local de internação, necessidade e tempo de suporte ventilatório e oxigênio e dias de internação total entre os grupos infecção isolada VSR e RV e codeteção VSR com RV32
- Tabela 4** - Análise de número e proporção de indivíduos segundo o escore clínico de gravidade e o grupo etiológico.....33
- Tabela 5** - Modelos Lineares Generalizados da associação entre etiologia e marcadores de gravidade na bronquiolite.....37

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Distribuição das cargas virais nas categorias: infecção única por VSR, infecção única por RV, codeteção com predomínio de VSR, codeteção com predomínio de RV34
- Gráfico 2** - Distribuição das cargas virais conforme o tempo decorrido entre o início dos sintomas e a coleta de secreção de nasofaringe e os grupos de identificação viral35

Resumo

Paulis M. *Análise da relação entre carga viral do vírus sincicial respiratório e rinovírus e gravidade clínica na infecção aguda de vias aéreas inferiores em lactentes hospitalizados* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: Os vírus respiratórios são os principais agentes etiológicos das infecções agudas de vias aéreas inferiores nas crianças. Em especial, na bronquiolite aguda, em que o vírus sincicial respiratório (VSR) e o rinovírus (RV) são agentes causais frequentes, particularmente em lactentes. A influência da quantificação de cargas virais sobre a gravidade da bronquiolite aguda é controversa. Este estudo analisa o papel da quantificação da carga viral na evolução clínica da bronquiolite em lactentes hospitalizados de 2013 a 2015. **MÉTODOS:** O estudo de coorte prospectivo incluiu crianças previamente híidas, com idade até 6 meses e 29 dias, internadas por bronquiolite aguda. Foram incluídas 70 crianças cujos testes moleculares quantitativos (qPCR e RT-qPCR), da secreção de nasofaringe coletada até 72 horas da admissão, foram positivos exclusivamente para VSR e RV como agentes únicos ou em coinfeção VSR com RV. Foram considerados desfechos de gravidade individualmente (tempo de internação, necessidade e tempo de internação em unidade de terapia intensiva (UTI) e de suporte ventilatório e tempo de oxigênio), assim como um escore clínico, baseado em uma variável latente que considerou os principais desfechos de gravidade tendo sido categorizado em leve, moderado e grave. Para a correlação da carga viral com os desfechos de gravidade foram realizados os testes de Kruskal Wallis, análises uni e multivariadas. Também foi analisada a distribuição de indivíduos nos tercis do escore clínico. **RESULTADOS:** Das 70 amostras de secreção de nasofaringe incluídas, 49 (70%) foram do grupo infecção única por VSR, 9 (13%) do grupo infecção única por RV e 12 (17%) do grupo codeteção VSR com RV. A etiologia, independentemente das cargas virais, não apresentou significância estatística nas análises comparativas entre os desfechos de gravidade individualmente. Porém, considerado o escore de gravidade, a infecção isolada por VSR apresentou maior número de casos graves (36,7%), diferentemente da infecção única por RV (22,2%). Nas codeteções, a maior gravidade foi observada quando o VSR predominou sobre o RV (44,4%). A maior carga viral de VSR, na infecção única, foi associada a maior tempo de suporte ventilatório ($p=0,018$), dias de oxigênio ($p=0,010$) e dias totais de internação ($p=0,014$) e, uma tendência, a maior tempo de internação em UTI ($p=0,050$). Quando ajustada para idade e dia da coleta da secreção de nasofaringe, a maior carga viral de VSR esteve associada a todos esses desfechos. Não houve significância estatística na análise uni e multivariada para a infecção isolada por RV e

codeteccção quando o RV predominou sobre o VSR. Na codeteccção, quando a carga viral do VSR predominou sobre o RV, houve maior tempo de administração de oxigênio ($p=0,042$). **CONCLUSÃO:** A maior carga viral do VSR, na infecção única, esteve associada à maior gravidade, assim como na coinfeccção, onde houve predomínio de VSR sobre o RV.

Descritores: Bronquiolite; Rhinovirus; Infecções por vírus respiratório sincicial; Coinfeccção; Carga viral; Índice de gravidade de doença.

Abstract

Paulis M. *Analysis of the relation between the viral loads of respiratory syncycial virus and rhinovirus and the clinical severity in the acute infection of the lower airways in hospitalized infants* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

INTRODUCTION: Respiratory virus are the major etiological agents of acute infections of the airways in children, particularly in acute bronchiolitis, whose most frequent causative agents are respiratory syncycial virus (RSV) and rhinovirus (RV), especially in infants. The influence of the quantification of the viral load on the severity of the acute bronchiolitis is controversial. This study analyzes the role the quantification of the viral load plays in the clinical evolution of bronchiolitis in hospitalized infants from 2013 to 2015.

METHODS: This was a prospective cohort study that included previously healthy children, at 0 - 6 months and 29 days of age, hospitalized due to acute bronchiolitis. 70 children were included, whose quantitative molecular tests (qPCR and RT-qPCR) of their nasopharyngeal aspirate, collected up to 72 hours after hospitalization, were positive exclusively to RSV and RV as single agents or with RSV and RV co-detection. This study considered the severity outcomes individually (time of hospitalization, need for and time of intensive care unit (ICU) hospitalization and ventilatory support and time on oxygen) as well as a clinical score, based on a latent variable which considered the major severity outcomes categorized as mild, moderate or severe. To correlate the viral load with the severity outcomes, Kruskal Wallis tests and univariate and multivariate analyses were carried out and the distribution of individuals in the three categories of the clinical score was analyzed. 70 samples of nasopharyngeal aspirate were included, 49 (70%) of which formed the group of single infection by RSV, 9 (13%) of which formed the group of single infection by RV and 12 (17%) formed the group of co-detection by RSV and RV. The etiology, regardless of the viral loads, did not present statistical significance in the comparative analyses in the severity outcomes individually, however, when taking into account the severity score, single RSV infection presented more severe cases (36,7%) as opposed to the single RV infection (22,2%). In the event of co-detection the severity was noticed when RSV predominated over RV (44,4%). Higher RSV viral load in single infection was associated with longer duration of ventilatory support ($p=0,018$), oxygen ($p=0,010$) and hospitalization days ($p=0,014$) and there was a tendency to greater time of ICU hospitalization ($p=0,050$). When adjusted for the age and day of collection of nasopharyngeal aspirate, higher RSV viral load was associated with all these outcomes. There was no statistical significance both

in the multivariate and in the univariate analyses for single RV infections and co-detections with a predominance of RV. In co-detections, when RSV viral load predominated, there was a longer duration of oxygen therapy ($p=0,042$). **CONCLUSION:** Higher RSV viral load was associated with greater severity in isolated infections. In co-infections, the predominance of RSV over RV was associated with greater clinical severity.

Descriptors: Bronchiolitis; Rhinovirus; Respiratory syncytial virus infections; Coinfection; Viral load; Severity of illness index.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As infecções agudas de vias aéreas inferiores, em especial a bronquiolite aguda (BA) e a pneumonia adquirida na comunidade (PAC) são importantes causas de morbimortalidade em crianças até 5 anos de idade.

No Brasil, no ano de 2018, foram internadas cerca de 240.000 crianças, entre zero e 14 anos de idade com diagnóstico de pneumonia (48 casos para cada 10.000 crianças/ano), sendo que 32% dessas internações ocorreram em menores de um ano de idade¹. Países desenvolvidos apresentam índices mais baixos de morbidade. Nos EUA, a taxa de hospitalização em menores de 18 anos de idade varia de 16 a 20 casos por 10.000 crianças/ano².

Embora dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostrem uma redução da mortalidade mundial por pneumonia nos últimos 40 anos (de 4 milhões para 1 milhão), essa taxa continua alta nos países em desenvolvimento e concentrada em crianças mais jovens³. Em 2017, mais de 800.000 crianças abaixo de 5 anos de idade morreram por pneumonia no mundo todo, representando 15% das causas de mortes nessa faixa etária⁴. No Brasil, dados governamentais (DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil) de 2018, revelam que o número de óbitos registrados por pneumonia em crianças abaixo de 14 anos de idade foi cerca de 2.300, sendo que destes, 59% ocorreram em menores de 1 ano de idade.

Os vírus respiratórios são responsáveis por quase 50% das PAC, 90% das bronquiolites e 85 a 95% das exacerbações de asma na criança⁵.

Em relação à bronquiolite aguda (BA), cuja etiologia é viral, foram registrados no Brasil, no ano de 2018, cerca de 59.200 casos em menores de 14 anos (12 casos por 10.000 crianças/ano), sendo que destes, 74% foram detectados em menores de 1 ano (9 casos por 10.000 crianças/ano). Na Europa e nos EUA, a maior taxa de internação também é observada em crianças menores de 1 ano (23 a 27/1000 crianças)^{6 7 8 9 10 11}, sobretudo em menores de 6 meses (44/1000 crianças)¹⁰. Dados da literatura internacional mostram que a BA é responsável por 18% das internações pediátricas^{11 12 10}, dos quais 5 a 10% são graves, necessitando de UTI¹⁰ e 2 a 3% requerendo ventilação mecânica¹¹. A mortalidade varia de 2,9 a 5,3/100.000 em crianças abaixo de 1 ano de idade¹¹. No Brasil, dados do DATASUS de 2018 mostram uma

mortalidade de 0,5% em crianças menores de 1 ano. A maior gravidade da BA está associada a alguns fatores de risco (prematuridade, lactentes jovens, doenças pulmonares, cardíacas e neuromusculares, imunodeprimidos), aliados a características ambientais e sócio econômicas, características estruturais do vírus, estado nutricional e de imunidade da criança. Nestas condições, a taxa de hospitalização e o tempo de internação podem aumentar em duas a três vezes quando comparadas às crianças saudáveis^{13 10 6 7 14}. Em um grupo especial de crianças, abaixo de dois anos de idade, com doenças crônicas como as portadoras de síndrome de Down, imunodeprimidas, transplantadas e com fibrose cística, a morbidade é ainda mais elevada, com incidência de até 200/1000 crianças e uma mortalidade que pode chegar a 20%¹⁵.

Os principais agentes causais da BA são os vírus respiratórios, em especial o vírus sincicial respiratório (VSR) e o rinovírus (RV)^{16 17}. O VSR é o principal vírus isolado em 70% dos casos^{2 18}. Com o advento das técnicas moleculares, alguns estudos apontam o RV como o segundo vírus mais prevalente^{2 16}, sendo responsável por até 18% das BA¹⁹. Outros vírus, como o influenza, parainfluenza, adenovírus, metapneumovírus, coronavírus e bocavírus também são responsáveis pelas infecções agudas das vias aéreas inferiores^{2 20}.

1.1. Características estruturais e clínicas do VSR

1.1.1. Características estruturais do VSR

O VSR é um vírus RNA de cadeia simples da família *Paramyxoviridae*, gênero *Pneumovirus*, composto de dois subgrupos antigênicos: A e B. Estes, inicialmente, foram identificados pelo teste de neutralização com soro hiperimune e, posteriormente, através da técnica dos anticorpos monoclonais. A identificação de alguns genótipos, em ambos os subgrupos, foi realizada, principalmente, através do sequenciamento dos genes variáveis da proteína G (GA1 a GA7 e GB1 a GB4)^{21 22}, como também do nucleocapsídeo (NP1 e NP3) e da proteína SH (genótipos SHL1 e SHL6)²¹. Novas variações genômicas têm sido encontradas nos últimos 20 anos em substituição aos sorotipos circulantes, como, por exemplo, o genótipo BA (Buenos Aires) para o subgrupo B, com suas subdivisões BA1 a BA10 e o genótipo URU (Uruguai) e suas subdivisões URU1

e URU 2. Em relação ao subgrupo B, em 2011 foi descrito também o genótipo SAB4 (África do Sul). Mais recentemente, no Japão, foram descritos os genótipos NA1 e NA2 para o subgrupo A e um genótipo VSR A derivado do NA1, denominado ON1 (Ontário) ^{21 22}.

O VSR é composto por três glicoproteínas de membrana de superfície (proteína G de adesão, proteína F de fusão e a pequena proteína SH hidrofóbica), três proteínas que formam o nucleocapsídeo (a grande subunidade da polimerase L, a proteína N e a proteína P), duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2), dois fatores de transcrição e replicação (M2-1 e M2-2) e uma proteína M matriz não glicosilada²³. A proteína F e G são responsáveis pela adesão, fusão e liberação do nucleocapsídeo do VSR para o citoplasma. A transcrição e replicação viral dependem das proteínas L, N, P, M1 e M2 que, junto ao RNA, formam o complexo ribonucleoproteína (RNP). As proteínas NS1 e NS2 não são essenciais para a replicação viral porém, em conjunto com a proteína solúvel G (liberada durante a replicação viral), interferem nos mecanismos de defesa celular, causando a inibição na resposta antiviral²³. A proteína SH permeabiliza a membrana celular e impede a apoptose da célula infectada. A Figura 1 mostra um modelo representativo da estrutura do VSR.

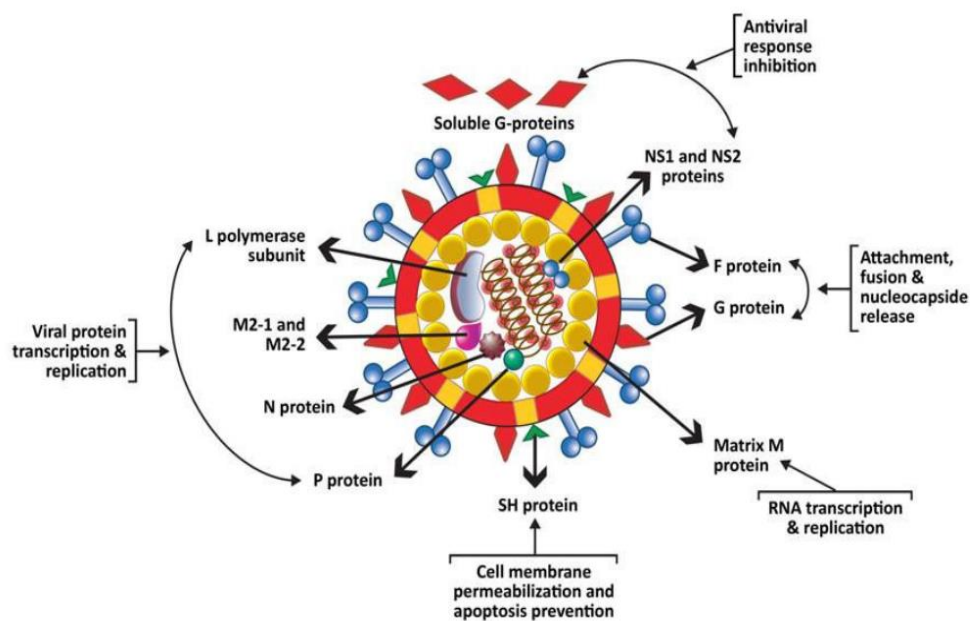


Figura 1 - Modelo representativo do vírus sincicial respiratório com as glicoproteínas de superfície (G, F e SH), proteínas associadas ao genoma RNA (L, N e P), proteínas não estruturais (NS1 e NS2), fatores de transcrição e replicação do RNA (M2-1 e M2-2) e a matriz M²³

1.1.2. Epidemiologia do VSR

A sazonalidade do VSR é variável, predominando nos meses frios nos países de clima temperado e, na primavera e outono, nas regiões tropicais. Os subgrupos A e B podem circular na mesma estação, com predomínio de um ou mais genótipos¹⁰. No Brasil, a sazonalidade do VSR difere de acordo com a região considerada. Enquanto na região sul e sudeste predomina nos meses mais frios do ano ^{24 25}, semelhante ao que ocorre em outros países da América do Sul e de clima temperado, no nordeste o seu pico ocorre nas estações de chuva ²⁶. Em estudo anteriormente realizado por nosso grupo em São Paulo, a incidência do VSR ocorreu no início dos meses de março-abril e persistiu até julho-agosto ²⁵.

A transmissão do VSR ocorre após o contato com secreção respiratória ou superfícies contaminadas, através da inoculação do vírus na mucosa ocular ou de nasofaringe. Sobrevive por 1 hora nas mãos e por 24 horas em superfícies não porosas. A sua excreção pode ocorrer, em média, até 10 dias, mas estudos apontam que pode perdurar por mais de 20 dias especialmente em menores de 1 ano de idade e em imunodeprimidos^{27 28}.

1.1.3. Características clínicas do VSR

As manifestações clínicas podem variar desde sintomas leves de infecção de vias aéreas superiores ou otite média aguda até quadros graves com comprometimento das vias aéreas inferiores, podendo causar a morte ¹⁰.

A gravidade da bronquiolite pode ser avaliada através de escore e desfechos clínicos. Vários são os escores clínicos descritos na literatura ^{29 30 31 32} e, geralmente, baseiam-se em critérios como aceitação alimentar, atividade da criança, frequência respiratória (FR), presença de sibilos na ausculta, uso de musculatura acessória, presença de cianose, necessidade de oxigênio e saturação de O₂ (SaO₂). Como são heterogêneos, a sua validação pode ser limitada na prática clínica. O escore que melhor apresentou concordância entre avaliadores e uma melhor correlação com o tempo de oxigênio e de internação foi o escore modificado de Tal (MTS)²⁹, que considera a FR pela idade (> ou < 6 meses), presença de sibilos e/ou estertores, SaO₂ e uso de musculatura

acessória. Em relação aos desfechos clínicos, os parâmetros mais utilizados para acessar gravidade são o tempo de internação, de UTI, de oxigênio e uso de ventilação mecânica^{33 34 35 36 37}.

Estudos de soroprevalência mostram que 70% das crianças até 1 ano de idade tiveram contato com o VSR e, ao término dos 2 anos, a totalidade teve pelo menos uma infecção e até 75% de reinfecção, com menor gravidade clínica.¹⁰ Nas crianças maiores e nos adultos, as reinfecções podem causar sintomas de vias aéreas superiores, asma e traqueobronquite. Nos idosos e adultos com comorbidades (doenças pulmonares crônicas, imunodeprimidos, cardiopatas, neoplasias, entre outras), o VSR é importante causa de hospitalizações por pneumonia (15% das PACs) e por exacerbação de doenças cardiopulmonares (10% dos casos), muito semelhante ao que ocorre com as infecções sazonais, pelo influenza. A maior mortalidade está relacionada à pneumonia³⁸.

Muitos estudos têm sido feitos em relação à gravidade dos diversos sorotipos na bronquiolite. No entanto, os dados ainda permanecem conflitantes. Vários estudos descrevem o grupo A como o de maior circulação em relação ao grupo B, podendo chegar até 3 vezes mais^{39 40 34}. No estudo de Walsh et al.⁴¹, as crianças menores de 2 anos com infecção pelo VSR A apresentaram maior gravidade em relação ao grupo B, principalmente na necessidade de ventilação mecânica. Em contrapartida, Martinello et al.⁴² não observaram diferença de gravidade entre os grupos A e B em 355 pacientes com infecção de vias aéreas pelo VSR. Entretanto, quando considerado o grupo A, o genótipo GA3 foi o que apresentou maior gravidade. Rodriguez et al.³⁴ também não observaram diferença na necessidade de oxigênio, dias de UTI e de internação entre os grupos A e B. Quando considerados os genótipos SHL2 e SHL6, Smith et al.⁴⁰ não acharam diferença de gravidade, como referido em estudo anterior⁴³.

Além do genótipo viral, outros fatores também podem influenciar na gravidade como, por exemplo, a variação da expressão gênica do VSR nas células mononucleares. No estudo de Rodriguez et al.³⁴, a superexpressão do interferon da inflamação e dos neutrófilos foi maior nas crianças com VSR A quando comparado com o VSR B, porém, sem alteração da resposta imune adaptativa. As crianças com genótipo GA5 tiveram menos superexpressão dos

interferons e maior ativação dos neutrófilos em relação aos genótipos GA2 e BA. Achados semelhantes também foram descritos por outros autores ^{44 45}.

1.2. Características estruturais e clínicas do RV

1.2.1. Características estruturais do RV

O RV é um vírus RNA de cadeia simples, da família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*. Caracteriza-se por ser um vírus pequeno, com diâmetro de 25 a 33 nm, constituído por um capsídeo icosaédrico não envelopado, composto por 60 placas protéicas, cada uma formada por quatro proteínas estruturais na região P1: VP1, VP2, VP3 e VP4 ⁴⁶. As proteínas VP1, VP2 e VP3 são responsáveis pela diversidade antigênica viral, enquanto a proteína VP4, ancora o núcleo do RNA para o capsídeo, conforme ilustrado na Figura 2 ⁴⁶.

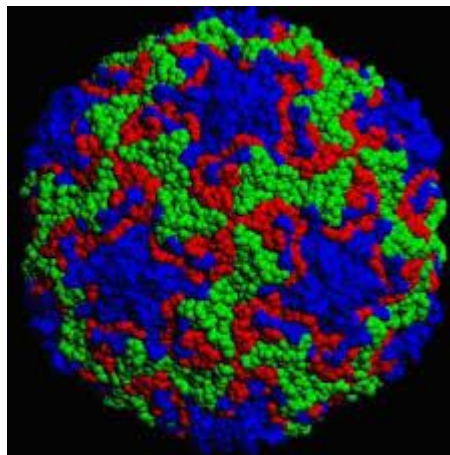


Figura 2 - Estrutura do capsídeo do Rinovírus com suas proteínas VP1 (em azul), VP2 (em verde), VP3 (em vermelho) e VP4 no interior (não visualizada)⁴⁶

As proteínas não estruturais (região P2 e P3) estão envolvidas na replicação e na constituição do genoma viral ^{47 48}. O início do genoma corresponde ao pequeno peptídeo (VPg) ligado covalentemente à região não traduzida (UTR) na extremidade 5' conforme mostra a Figura 3.

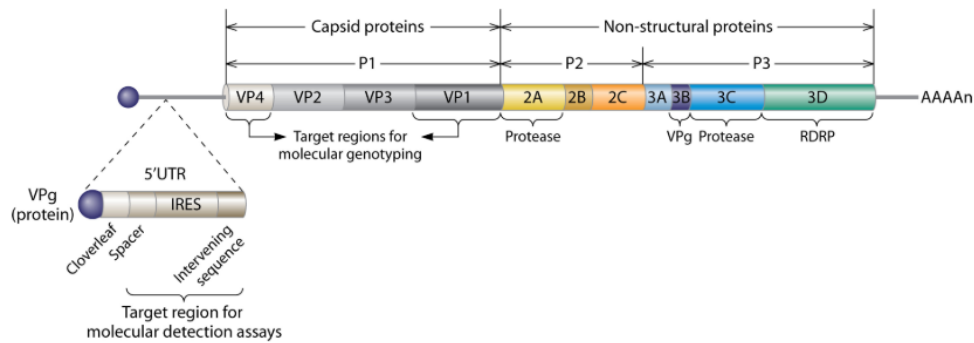


Figura 3 - Estrutura genômica do RV constituída pela região não traduzida (UTR) na extremidade 5' e início do genoma com o pequeno peptídeo VPg. A proteína P1 forma o capsídeo do RV, P2 e P3 produzem a VPg, protease e a polimerase RNA dependente (RDRP) ⁴⁷

Existem mais de 100 sorotipos de RV e três grupos geneticamente distintos: RV A (74 sorotipos), RV B (25 sorotipos) e RV C (50 sorotipos) ⁴⁷. Os RVs podem ser divididos em 2 grupos principais: grupo *major* (90% dos sorotipos descritos) e grupo *minor* (10% dos sorotipos restantes).

1.2.2. Epidemiologia do RV

As infecções por RV ocorrem o ano todo em países temperados, com picos entre a primavera e o outono⁴⁹. O RV tipo C tem uma sazonalidade mais acentuada no outono e no inverno e na estação chuvosa nos trópicos. No Brasil, circula praticamente o ano todo, com um aumento dos casos no inverno^{50 51}.

A transmissão do RV se faz através de gotículas em aerossóis, contato direto por secreções respiratórias ou superfícies contaminadas ou mesmo por inoculação direta na mucosa nasal ou conjuntival^{52 53}. O RV, em temperatura ambiente, sobrevive por horas a dias em ambientes internos e por 2 horas na pele íntegra.

1.2.3. Características clínicas do RV

O RV está associado às infecções agudas de vias aéreas superiores, resfriado comum, otite média aguda e sinusite. Com o advento das técnicas moleculares para identificação viral, foi possível identificar o RV como agente causal de infecções de vias aéreas inferiores, como exacerbações de asma, pneumonia e quadros graves de bronquiolite, particularmente nas crianças, nos idosos, nos pacientes com asma e nos imunodeprimidos⁴⁷. Cerca de 14% a 50%

das crianças assintomáticas são portadoras do RV na nasofaringe⁵⁴, diferentemente dos adultos, com uma taxa de detecção de 2% nos assintomáticos.⁴⁷ O RV é importante agente causador de codetecção nas infecções de vias aéreas inferiores.^{39 55} Pode estar associado ao VSR ou outros vírus respiratórios (15% a 6% dos casos, respectivamente) sendo que a sua codetecção com VSR pode determinar maior tempo de internação nas crianças hospitalizadas ⁴⁷.

1.3. Métodos de identificação viral

Vários são os métodos disponíveis para a identificação dos vírus respiratórios: imunocromatografia (IC), imunofluorescência direta (IFD), sorologia (incluindo técnicas de inibição de hemaglutinação, fixação de complemento, imunoenensaio enzimático)⁵³, métodos moleculares de amplificação do ácido nucléico viral (ex: *Polimerase chain reaction – PCR ou reverse transcriptase polimerase chain reaction - RT-PCR*) e cultura viral. Apesar de a cultura viral ser considerada o padrão ouro, a sua realização apresenta uma série de restrições pela dificuldade técnica devido à necessidade de meios de cultura específicos de acordo com o vírus a ser identificado e morosidade no resultado⁵⁶. Os testes imunoenzimáticos permitem a identificação viral em pouco tempo (15 a 30 minutos). Entretanto, apresentam baixa sensibilidade para a maioria dos vírus ^{53 56}. O mesmo pode ser observado para a IFD (identifica, geralmente, 8 vírus)⁵⁷, com exceção para o VSR que, com o advento de anticorpos monoclonais de excelente qualidade, apresenta sensibilidade de até 97% ⁵³. Com as técnicas de biologia molecular (PCR e RT-PCR), houve aumento da capacidade diagnóstica dos vírus respiratórios como os principais causadores das infecções de vias aéreas inferiores na criança²⁰. O RT-PCR pode ser realizado no método monoplex em reações específicas para o Influenza A e B e VSR⁵⁶ e no método multiplex, onde é possível identificar até 21 vírus respiratórios de forma rápida, com maior sensibilidade e especificidade (92 x 99% respectivamente) ^{56 53}. Os testes moleculares podem ter variação na sensibilidade, de acordo com o dia da coleta em relação ao início dos sintomas⁵³. Nos adultos, a sua sensibilidade é menor quando comparados às crianças, devido à menor taxa de excreção viral⁵³. A interpretação deste método merece

especial atenção, pois algumas vezes a presença do material genético encontrado não indica necessariamente infecção viral aguda⁵³, mas sim excreção prolongada (p.ex: imunocomprometidos) ou colonização^{20 58 59}. Por outro lado, resultados falso negativos podem ocorrer na mudança do genoma, assim como por problemas na técnica de coleta e processamento⁵³.

1.3.1. Codeteção viral pelos métodos moleculares

Devido à alta sensibilidade e especificidade da técnica de PCR ou RT-PCR, não é raro encontrar dois ou mais vírus em uma mesma amostra de secreção respiratória^{18 12 60}. A codeteção viral pode estar presente em até 50% dos casos das infecção respiratórias agudas²⁰, sendo a codeteção VSR e RV a mais prevalente^{2 56}. O significado da codeteção é motivo de interesse na literatura, principalmente em relação à gravidade da apresentação clínica das infecções de vias aéreas inferiores. Alguns autores sugerem que crianças com codeteção viral são hospitalizadas com maior frequência quando comparadas às crianças com infecção única⁶¹. Para outros autores^{62 63 64}, não há diferença na gravidade clínica da doença quando identificados um ou mais vírus. Contudo, alguns autores sugerem aumento do risco de mortalidade nas crianças mais jovens que apresentam codeteção viral nas amostras da secreção respiratória⁶⁴. Richard et al.⁶⁵ demonstraram que a codeteção viral aumenta em 3 vezes o risco de necessidade de UTI.

1.3.2. Identificação viral quantitativa por PCR (qPCR)

O emprego da técnica molecular (PCR ou RT-PCR) permite não apenas identificar o vírus, como também quantificar a sua carga viral, através do método quantitativo (qRT-PCR) em cópias/ml, assim como pelo método semiquantitativo (cycle threshold - Ct)⁶⁶. O Ct indica o ciclo de amplificação em que a detecção do sistema considera a amostra positiva para determinado vírus, representado pela curva fluorescente exponencial que ultrapassa a positividade da linha de base, conforme ilustrado na Figura 4. Valores de Ct <40 são considerados positivos e amostras com alta carga viral apresentam valores de Ct menores⁶⁷.

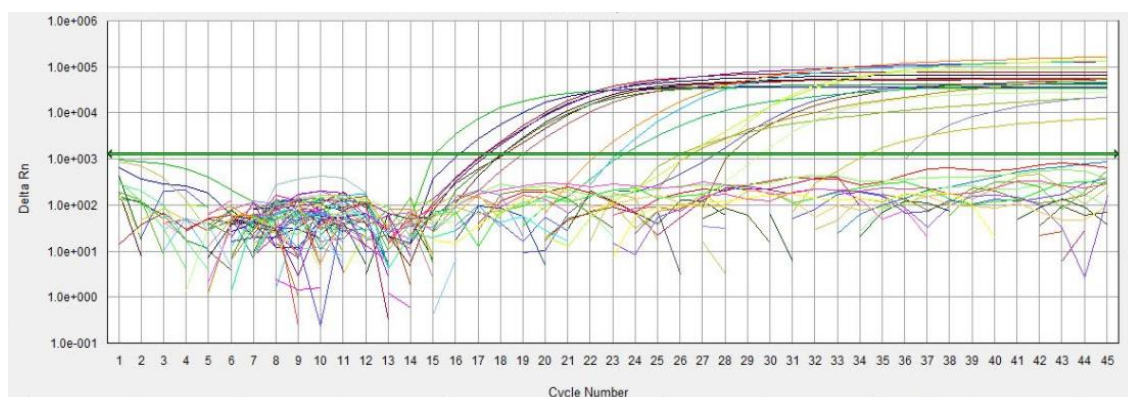


Figura 4 - Relação entre o cycle threshold, linha de intersecção (em verde) e intensidade da emissão do corante fluorescente durante a reação do qPCR ou qRT-PCR nas amostras de nasofaringe contendo vírus respiratórios

1.4. Associação da carga viral com a gravidade da bronquiolite

A quantificação da carga viral, em cópias/ml, permite analisar, em números absolutos, a quantidade de vírus encontrada na amostra de secreção de nasofaringe da criança com bronquiolite e sua correlação com a apresentação clínica. Não obstante, a sua relação com a gravidade da doença ainda é conflitante na literatura.

No estudo de Houben et al.⁶⁸ houve uma associação significativa entre carga viral e gravidade da doença na primeira infecção por VSR, especialmente na infecção única. Tal relação não foi encontrada para a infecção por RV.

Bosis et al.⁶⁹ não observaram impacto da carga viral do VSR e do bocavírus com a gravidade do primeiro episódio de chiado na criança internada. Opostamente, Hasegawa et al.¹² constataram a necessidade de maior tempo de internação e de UTI nas infecções por VSR com maior carga viral.

Anna Franz et al.¹⁷ observaram a carga viral na secreção de nasofaringe que não teve impacto estatisticamente significativo na gravidade das doenças causadas por VSR, RV, adenovírus e bocavírus, nem tampouco relação com marcadores inflamatórios sanguíneos, como leucocitose e dosagem de proteína C reativa. Exceção feita para a infecção isolada por adenovírus, onde a carga viral elevada teve relação com valores superiores a 5 mg/dl da proteína C reativa.

Para Piedra et al.⁷⁰ a carga viral mais alta do VSR, no início da infecção, pode ser responsável por uma resposta imune inata mais robusta, sendo um fator protetor contra a evolução da doença hipóxico-isquêmica com uma resolução mais rápida.

Um dos objetivos primários da vigilância da OMS especificamente para o VSR visa melhorar o entendimento da hospitalização causada por ele⁷¹. A quantificação da carga viral pode ser um dos fatores a auxiliar este processo, através da sua relação com desfechos de gravidade como tempo de internação, necessidade e dias de suporte de oxigênio, necessidade e dias de UTI e de ventilação mecânica. Padronizar procedimentos laboratoriais de qualidade para detecção molecular e tipagem de VSR também compreendem objetivos secundários.⁷¹

Diante do exposto, entender o significado da carga viral nas infecções respiratórias agudas na infância, especialmente por agentes frequentes como VSR e RV e sua relação com a idade e desfechos de gravidade, pode auxiliar em estratégias de prevenção e vigilância clínica e o desenvolvimento de novas terapêuticas

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A importância da carga viral em relação à gravidade da bronquiolite ainda é motivo de estudo na literatura. Considerando que o VSR é o principal e o RV um importante agente etiológico dessa infecção, particularmente em lactentes, este estudo pretende analisar o papel da quantificação da carga viral na predição da evolução clínica. Esse conhecimento pode contribuir para aprimorar medidas profiláticas e terapêuticas e melhorar o prognóstico de lactentes internados por infecção única ou em codeteção causadas por esses agentes virais.

HIPÓTESE

3. HIPÓTESE

As cargas virais de vírus sincicial respiratório e/ou rinovirus em lactentes internados por bronquiolite até 6 meses e 29 dias de idade estão associadas à gravidade da condição clínica.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Analisar as influências das cargas virais quantitativas nas infecções únicas por VSR, por RV e nas codetecções entre ambos, sobre a gravidade da bronquiolite em lactentes hospitalizados.

4.2. Objetivos específicos

1. Analisar as prevalências e as características clínicas e demográficas das infecções por VSR e por RV, como agentes únicos ou em codetecção, em lactentes hospitalizados por bronquiolite.
2. Analisar o tempo decorrido entre o início dos sintomas respiratórios e a coleta da secreção de nasofaringe para pesquisa viral.
3. Analisar os valores de cargas virais encontrados nas infecções por VSR e por RV, como agentes únicos e nas codetecções.
4. Analisar as associações entre as cargas virais encontradas nas infecções isoladas por VSR, por RV e nas codetecções, com os desfechos de gravidade ajustadas para possíveis fatores confundidores.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1. Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado no CEP-HU-USP: 1664/17 – SISNEP CAAE: 72113817.8.3001.0076 como uma extensão do projeto matriz “Estudo de determinantes da gravidade da infecção por Vírus Sincicial Respiratório em crianças: análises do perfil de expressão gênica do hospedeiro e dos genótipos virais”. O projeto matriz foi aprovado na CEP-HU/USP: 1011/10 – SISNEP CAAE:0039.0.198.000-10. Área temática especial: Grupo II – Genética Humana, patrocinado pela Fundação do Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 12/22854-9)

Os responsáveis pelos lactentes incluídos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), após esclarecimentos sobre o estudo. (Anexo A)

5.2. Casuística

O estudo foi realizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), considerado hospital secundário: atende pacientes de média complexidade. Durante o período de inclusão, de 2013 a 2015, a média de atendimento no Pronto Socorro Infantil (PSI) foi de cerca de 4500 crianças/mês sendo que a maioria era proveniente da região oeste da cidade de São Paulo (composta pelos distritos do Butantã, Morumbi, Rio Pequeno, Vila Sônia e Raposo Tavares), cuja área de abrangência corresponde a quase 4% da área total do município de São Paulo, com uma população aproximada de 400 mil habitantes (www.prefeitura.sp.gov.br).

No período de março de 2013 a agosto de 2015 foram analisados os lactentes de zero a seis meses e 29 dias de idade, com quadro de bronquiolite selecionados para o projeto matriz, e que preencheram os critérios de inclusão descritos abaixo. O diagnóstico clínico de bronquiolite considerou os critérios da Academia Americana de Pediatria: infecção respiratória aguda associada a coriza, tosse, taquipneia, sibilos, estertores pulmonares e desconforto respiratório.⁸

Foram considerados critérios de inclusão:

- Idade entre 0 a 6 meses e 29 dias de vida
- Primeiro episódio de sibilância
- Secreção de nasofaringe com identificação de VSR ou de RV como agentes únicos ou em codeteção VSR com RV

Como critérios de exclusão foram considerados:

- uso de corticosteroide, por via oral ou por via inalatória, nos últimos 30 dias antecedendo a infecção atual
- uso recente (últimos 15 dias) ou atual de antibiótico
- crise de sibilância anterior
- crianças portadoras de comorbidades: cardiopatia, pneumopatia, prematuridade (< 37 semanas) ou outra comorbidade.

5.3. Delineamento do Estudo

Do estudo matriz foram selecionadas as amostras de nasofaringe com teste molecular positivo para VSR e RV como agentes únicos ou para a codeteção entre ambos, coletadas de lactentes hospitalizados no período de 2013 a 2015 no Hospital Universitário da USP, conforme esquematizado na Figura 5.

Foram revistos e confirmados os critérios de inclusão (*check list* -Anexo B) e coletados os dados clínicos e demográficos do protocolo clínico de sintomas e evolução durante a internação e por meio da revisão de prontuários (Anexo C).

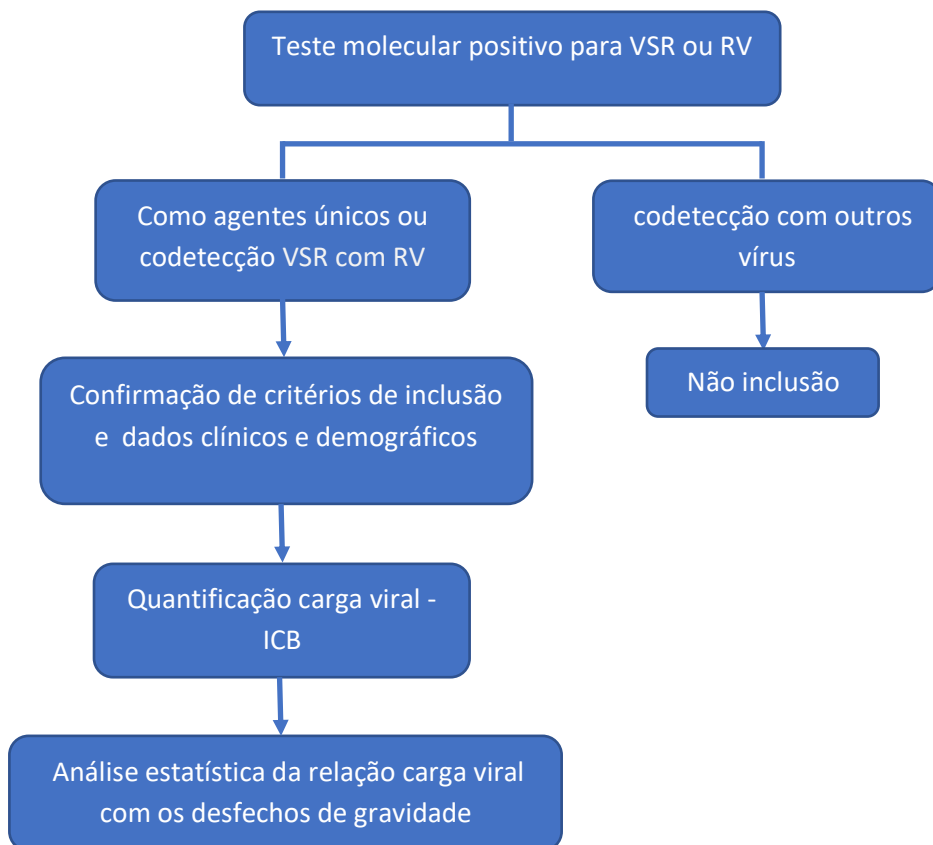


Figura 5 - Esquematização do delineamento do estudo

Os protocolos clínicos padronizados contaram com as seguintes informações:

- ✓ História clínica, que incluiu presença e duração de sintomas como: febre, tosse, coriza, obstrução nasal, cianose, apneia, uso de musculatura acessória para respirar, dificuldade para mamar, sonolência e irritabilidade.
- ✓ Local de internação: PSI, enfermaria/berçário, UTI pediátrica/neonatal
- ✓ Dados de exame físico à admissão no PSI: frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC), saturação de oxigênio (SaO₂), ausculta pulmonar (presença de sibilos e/ou estertores), sinais de desconforto respiratório (retração subdiafragmática, intercostal e de fúrcula, batimento de asa de nariz), gemência, níveis de atividade/prostração.

Também foram coletados dados demográficos e antecedentes pessoais e familiares dos lactentes incluídos.

5.4. Análises do material biológico

5.4.1. Amostras de secreção respiratória de aspirado de nasofaringe

As amostras de aspirado de nasofaringe foram coletadas no momento da admissão ou até as primeiras 72 horas de internação, por equipe de enfermagem treinada, de segunda a sexta-feira das 7 às 11 horas.

Para a coleta foram utilizadas luvas estéreis, sonda de aspiração nasal com uma extremidade conectada à extensão de silicone do frasco de Lukens e outra ligada à rede de vácuo de parede. A aspiração foi realizada com instilação prévia de 1 ml de solução salina isotônica, em ambas as narinas. Ao final do procedimento, foi adicionado um mililitro de solução fisiológica ao frasco coletor. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório Clínico do HU-USP em banho de gelo e processadas em até 4 horas. Após a separação em fluxo laminar, de uma alíquota de 1ml, para realização da Imunofluorescência Indireta (como rotina pré-estabelecida no serviço para as crianças internadas por infecção de vias aéreas inferiores), o restante do material foi armazenado no frasco de Lukens entre 4 a 8°C até a retirada e transporte em banho de gelo pela equipe do laboratório de virologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) para a análise molecular.

5.4.2. Extração do RNA/DNA total de amostras de aspirado de nasofaringe

A extração do material genético viral foi realizada no laboratório de virologia do ICB -USP utilizando-se uma alíquota de 500µl de amostra com 500µl de tampão de lise (TL) do *Nuclisens® Iso Kit (BioMerieux, Lyon, France)*, o qual extrai RNA e DNA de 22 amostras simultâneas, além de um controle negativo e um controle positivo. Em 45 minutos, com o protocolo *off-board* (conforme instruções do fabricante) foi obtido um volume final de 50 µl de ácido nucléico total extraído.

Na alíquota de 1 ml, contendo amostra e TL, após descongelamento, foram acrescidos 50µL de Sílica Magnética que, sob condições de elevadas concentrações de sal, ligaram-se aos ácidos nucléicos. Estas partículas de sílica atuam como fase sólida e os componentes que não contêm ácidos nucléicos são

removidos através de várias etapas de lavagens, efetuadas no equipamento *Nuclisens EasyMag* (*BioMerieux, Lyon, France*). Por último, os ácidos nucleicos foram eluídos da fase sólida com um tampão de eluição, denominado *Nuclisens Elution Buffer* (*BioMerieux, Lyon, France*). O eluído, contendo RNA e DNA total foi armazenado em freezer a 70 °C negativos até o momento da sua utilização.

Foram utilizados *primers* e sondas, previamente descritos na literatura (*Kit Non-influenza primers set*)^{72 73}, gentilmente cedidos pelo CDC (Centro de Controle e Prevenção, Atlanta, EUA Disease), para 14 vírus diferentes: vírus sincicial respiratório humano (VSR), metapneumovirus humano, adenovírus, rinovírus humano (RV), parainfluenza 1 a 4, coronavírus HKU1, NL63, 229E e OC43, além de *primers* e sondas comerciais para Influenza A e B (Invitrogen).

5.4.3. Detecção do VSR e RV por RT-PCR em Tempo Real (qPCR) one-step

A amplificação em tempo real “one step”, ou seja, a transcrição reversa e amplificação simultânea foi efetuada em placa de PCR de 96 orifícios (Applied Biosystems). Cada amostra foi amplificada separadamente para os diferentes vírus testados, no qual 5µL de RNA foram diluídos em tampão 20 mM de Tris-HCl [pH 8.4] / 50 mM de KCl / 2 mM de MgCl₂ (Ambion), 10 pMoles de cada primer (positivo e negativo), 10 pMoles de cada sonda, 1 U de Enzyme (Ambion), 0.2 mM de cada dNTP e água UltraPure q.s.p. 25 µL. As placas foram amplificadas no termociclador Real Time 3300 PCR System (Applied Biosystems). A amplificação foi efetuada a partir de uma etapa de transcrição de 30°C por 15 minutos, seguida pela desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos de 94°C por 15 segundos, para desnaturação das fitas de DNA; 56°C por 30 segundos, para o pareamento dos primers e, 72°C por 15 segundos, para a extensão das fitas de DNA. Tanto para o VSR quanto para RV, foram utilizadas pelo menos duas diluições de amostras-padrão com quantificação pré-definida, o que permitiu a quantificação absoluta do número de cópias contidas em cada amostra. O conjunto de *primers* e sondas utilizados para transcrição

reversa e amplificação simultânea (one-step PCR em tempo real) de VSR e RV estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Conjunto de Primers e sondas utilizados para transcrição reversa e amplificação simultânea (one-step PCR em tempo real) de VSR e RV

Vírus	Primer ID	Gene	Sequência 5'>3'	Tamanho Amplicon
VSR	VSR_fw	Matriz	GGC AAA TAT GGA AAC ATA CGT GAA	100
VSR	VSR_rev	Matriz	TCT TTT TCT AGG ACA TTG TAY TGA ACA G	100
VSR	VSR_sonda	Matriz	^{FAM} CTG TGT ATG TGG AGC CTT CGT GAA GCT- ^{QSY}	100
RV	RV_fwa	Polimerase	CYA GCC TGC GTG GC	90
RV	RV_fwb	Polimerase	CYA GCC TGC GTG GT	90
RV	RV_rev	Polimerase	GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA	90
RV	RV_sonda	Polimerase	^{FAM} TCC TCC GGC CCC TGA ATG YGG C - ^{QSY}	90

LEGENDA: A- adenina; G- Guanina; C- citosina; T- Tiamina.; FAM- Detector (Fluoróforo) ; QSY- silenciador do detector (quencher)

5.5. Análise Estatística

Para as análises propostas, os lactentes foram divididos em três grupos, segundo as etiologias e as cargas virais:

- ✓ Indivíduos com amostras positivas para infecção única para VSR
- ✓ Indivíduos com amostras positivas para infecção única para RV
- ✓ Indivíduos com amostras positivas para codeteção VSR com RV, subdivididos em:
 - Carga viral VSR maior que RV
 - Carga viral VSR menor que RV

Quanto ao tempo decorrido do início dos sintomas e coleta da secreção de nasofaringe, os lactentes foram divididos em dois grupos:

- ✓ Até 5 dias
- ✓ Superior a 5 dias

Os critérios de gravidade considerados na internação foram:

- ✓ Necessidade de UTI
- ✓ Tempo de internação em UTI em dias
- ✓ Necessidade de ventilação não invasiva (CPAP ou BIPAP)
- ✓ Tempo de ventilação não invasiva em dias
- ✓ Necessidade de ventilação mecânica (intubação orotraqueal)
- ✓ Tempo de ventilação mecânica em dias
- ✓ Necessidade de oxigênio
- ✓ Tempo de oxigênio em dias
- ✓ Tempo de internação total em dias

As características demográficas e os antecedentes dos lactentes (exposição ao tabagismo e aleitamento materno) foram descritos e analisados segundo os resultados de pesquisa viral, com uso de frequências absolutas e relativas. Para as suas associações, foi aplicado o teste da razão de verossimilhança.

As características relacionadas aos desfechos de gravidade foram descritas com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparadas com o teste de Kruskal-Wallis.

Para realização das análises foi utilizado o *for Windows* versão 20.0 e para tabulação dos dados, o *software* Microsoft Excel 2003.

Para analisar a correlação da gravidade com a carga viral foi criada uma variável latente. Para tanto, utilizou-se o programa estatístico STATA 14, através de seu comando "sem" (*structural equation model* – modelo de equações estruturais). A variável latente partiu das seguintes variáveis mensuradas: internação em UTI (sim ou não e número de dias), uso de intubação orotraqueal (sim ou não e número de dias), uso de CPAP (sim ou não e número de dias), dias de uso de oxigênio e de internação. Considerou-se a existência de correlação entre as variáveis binárias (uso sim-não) e os respectivos números de dias, assim como entre a internação em UTI e o número de dias de internação. A variável latente criada foi categorizada em tercís, sendo o primeiro tercil denominado baixa gravidade, o segundo, média gravidade e, o terceiro, alta gravidade. Para uma correspondência clínica, os pacientes com baixa gravidade ficaram no máximo 3 dias internados, podendo ter precisado de oxigênio, mas

não foram para a UTI; os pacientes com média gravidade ficaram no máximo 6 dias internados, precisando de O₂, mas não chegaram a ir para UTI; os pacientes de alta gravidade todos necessitaram de O₂ e UTI e/ou tiveram internação superior a 6 dias.

A carga viral absoluta encontrada na reação de RT-PCR foi transformada em log₁₀ cópias/ml.

Nas análises uni e multivariada para os desfechos de gravidade foram feitos ajustes para o efeito da idade (a qual foi dividida em três grupos: menores de 29 dias, entre 29 e 90 dias e maiores de 90 dias) e do tempo decorrido entre o início dos sintomas e coleta da secreção nasofaríngea (menor ou igual a 5 dias ou maior que 5 dias). Foram construídos modelos lineares generalizados utilizando-se estimativa robusta do erro padrão.

O teste de Fisher foi utilizado para a análise da distribuição das categorias de cargas virais segundo as categorias de gravidade. O nível de significância considerado foi de 5%.

5.5.1. Cálculo da amostra

Para o cálculo da amostra, supondo um coeficiente de correlação de 0,40 entre carga viral e dias de internação assim como uma probabilidade de ocorrer erro do tipo 1 fixada em 5% e de ocorrer erro de tipo 2 fixada em 20%, chegou-se à conclusão de que seriam necessários 47 indivíduos para se encontrar uma correlação significativa

RESULTADOS

6. RESULTADOS

Das 124 amostras inicialmente selecionadas no estudo matriz, o VSR foi identificado como agente único em 54 delas (43,54%) e o RV, em nove (7,25%). A codetecção VSR com RV foi encontrada em 15 amostras (12,09%) e em duas outras (1,61%) foi observada a associação VSR com RV e Adenovírus. A codetecção de VSR com outros vírus esteve presente em 20 amostras (16,12%) e de RV, em duas outras (1,61%). Treze amostras (10,48%) identificaram outro agente único que não VSR e RV. A codetecção não VSR com não RV esteve presente em três amostras (2,41%) e em outras seis (4,83%) não foi identificado vírus algum.

No total de amostras, o VSR esteve presente em 91 delas (73,38%) e o RV em outras 29 (23,38%).

A Figura 6 mostra a distribuição dos vírus encontrados nas amostras de aspirado de secreção de nasofaringe pela técnica PCR/ RT-PCR.

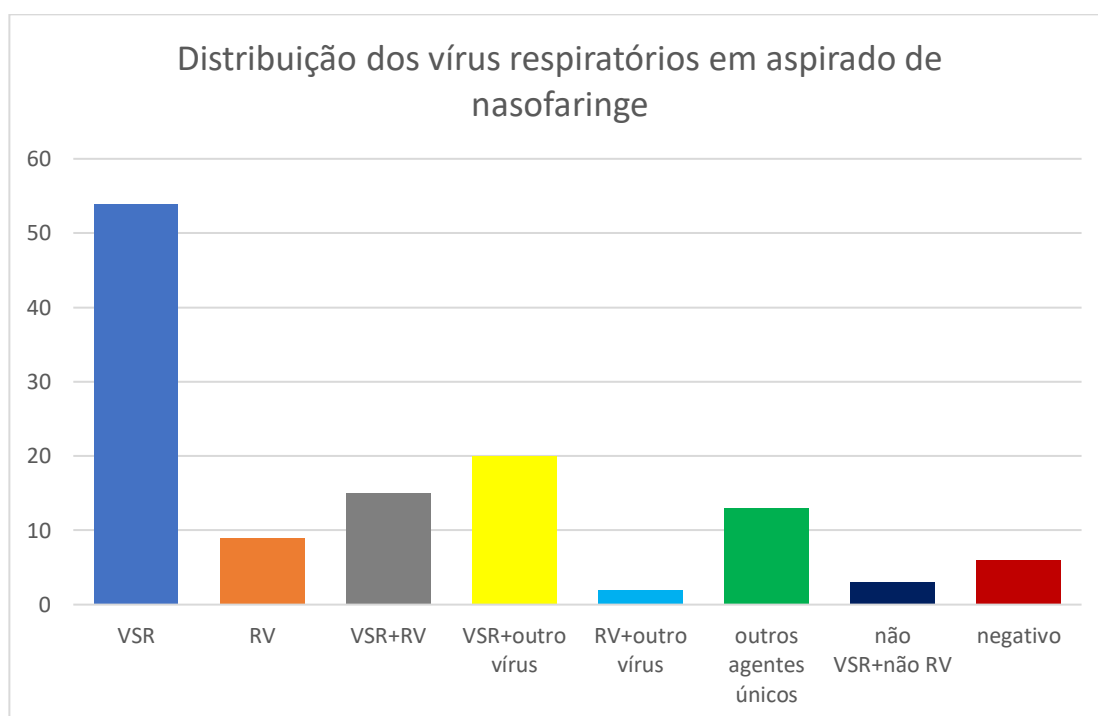


Figura 6 - Distribuição dos vírus encontrados nas amostras de aspirado de secreção nasofaringe no estudo matriz

Foram, portanto, elegíveis para as análises associadas às cargas virais, 78 lactentes. Entretanto, oito deles foram excluídos após a revisão dos dados de internação: duas devido história de uso prévio de corticosteroide (uma do grupo

codeteção VSR com RV e outra do grupo VSR); outro por cardiopatia do tipo comunicação interventricular (grupo codeteção VSR com RV) e quatro por história de prematuridade (três do grupo VSR e uma do grupo codeteção VSR com RV). Um lactente teve o prontuário extraviado (grupo VSR). Desta forma, foram incluídas 70 lactentes, conforme mostra a Figura 7.

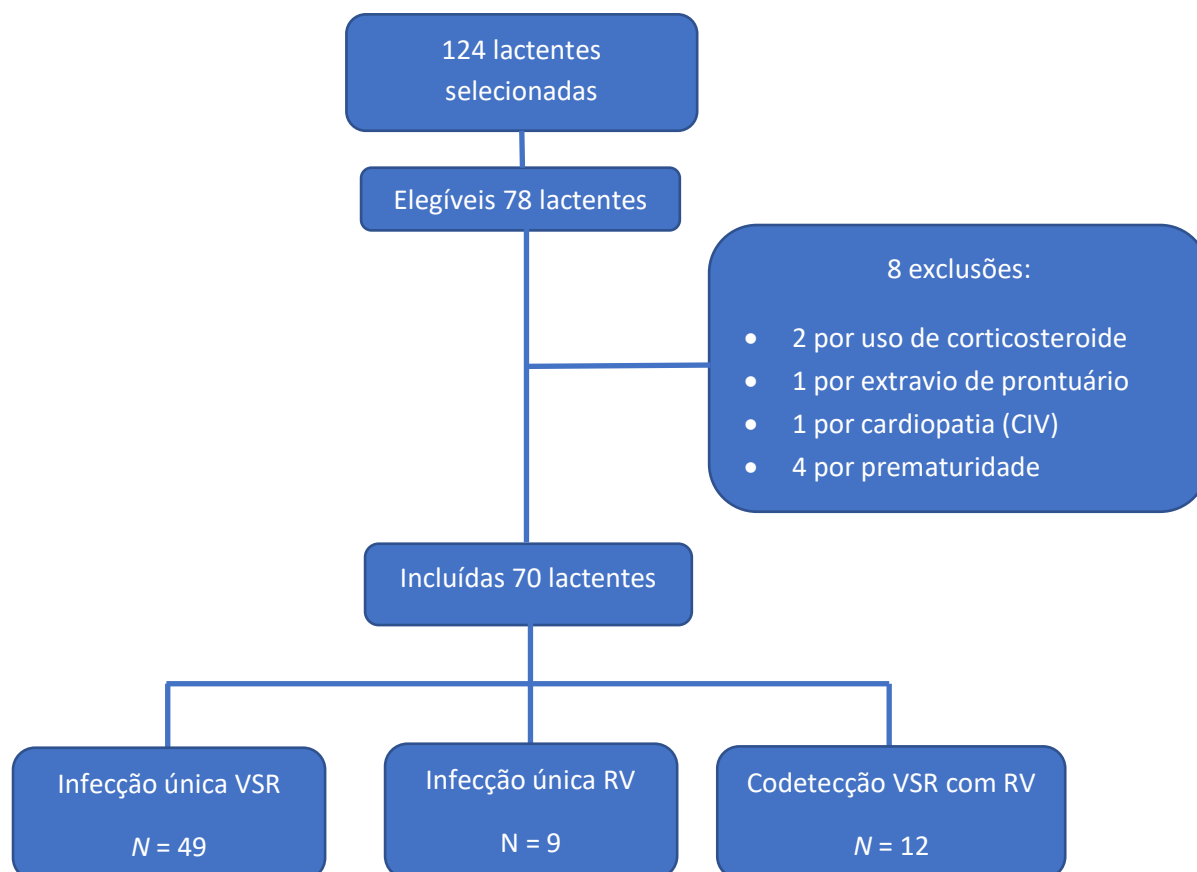


Figura 7 - Característica das amostras incluídas no estudo

6.1. Análises descritivas e comparativas dos grupos segundo a etiologia

Dos 70 lactentes analisados, 49 (70%) apresentaram infecção isolada por VSR, 9 (13%) infecção isolada por RV e 12 (17%) codetecção VSR com RV.

Houve um predomínio de infecção em lactentes do sexo masculino e de raça branca. As informações sobre aleitamento materno (leite materno exclusivo até os 6 meses de vida sem introdução de fórmula láctea) esteve presente em 63 crianças (90%) e, sobre tabagismo passivo (exposição a qualquer familiar fumante residente no mesmo domicílio), em 42 delas (60%). A Tabela 2 mostra as descrições e as comparações dos lactentes de acordo com idade, sexo, raça, história de aleitamento materno e tabagismo, segundo resultado da pesquisa viral. Não houve diferenças estatisticamente significantes entres os grupos etiológicos nas análises dessas variáveis.

Tabela 2 - Análises descritivas e comparativas das características demográficas e antecedentes dos pacientes incluídos entre os grupos de infecção isolada por VSR e RV e codeteccção entre ambos os vírus

Variável	Resultado pesquisa viral			Total (N = 70)	p
	VSR (N = 49)	RV (N = 9)	VSR com RV (N = 12)		
Sexo, n (%)					0,806
Feminino	16 (32,7)	2 (22,2)	4 (33,3)	22 (31,4)	
Masculino	33 (67,3)	7 (77,8)	8 (66,7)	48 (68,6)	
Idade (dias)					0,864*
média ± DP	71,6 ± 46,6	67,1 ± 56,9	67,8 ± 43,5	70,4 ± 46,8	
mediana (mín.; máx.)	61 (11; 168)	51 (9; 167)	44,5 (24; 132)	54,5 (9; 168)	
Raça, n (%)					0,238
Branca	32 (65,3)	5 (55,6)	5 (41,7)	42 (60)	
Parda	14 (28,6)	4 (44,4)	7 (58,3)	25 (35,7)	
Preta	3 (6,1)	0 (0)	0 (0)	3 (4,3)	
Aleitamento materno**, n (%)&					0,570
Não	22 (47,8)	2 (33,3)	4 (33,3)	28 (43,8)	
Sim	24 (52,2)	4 (66,7)	8 (66,7)	36 (56,3)	
Tabagismo***, n (%)&					0,170
Não	19 (63,3)	4 (100)	6 (75)	29 (69)	
Sim	11 (36,7)	0 (0)	2 (25)	13 (31)	

Teste da razão de verossimilhanças; *Teste Kruskal-Wallis; & Nem todos os pacientes possuem a informação. **aleitamento materno exclusivo até 6 meses sem introdução de fórmula láctea

***Tabagismo: qualquer familiar fumante dentro do domicílio

Também não houve significância estatística nas análises comparativas entre os desfechos de gravidade: “local de internação”, “suporte ventilatório”, “dias de oxigênio e “dias de internação”, de acordo com a pesquisa qualitativa viral dos grupos analisados, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Desfechos de gravidade segundo local de internação, necessidade e tempo de suporte ventilatório e oxigênio e dias de internação total entre os grupos infecção isolada VSR e RV e codeteção VSR com RV

Variável	Resultado pesquisa viral			Total (N = 70)	p
	VSR (N = 49)	RV (N = 9)	VSR com RV (N = 12)		
Local de internação, n(%)					0,625
PSI	11 (22,4)	5 (55,6)	3 (25)	19 (27,1)	
Enfermaria	23 (46,9)	2 (22,2)	5 (41,7)	30 (42,9)	
Berçário	5 (10,2)	1 (11,1)	1 (8,3)	7 (10)	
UTI	10 (20,4)	1 (11,1)	3 (25)	14 (20)	
Tempo UTI (dias)					0,710*
média ± DP	1,55 ± 3,8	0,56 ± 1,67	2,42 ± 5,81	1,57 ± 4	
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 15)	0 (0; 5)	0 (0; 20)	0 (0; 20)	
Suporte ventilatório, n (%)					0,631
Não	42 (85,7)	8 (88,9)	9 (75)	59 (84,3)	
Sim	7 (14,3)	1 (11,1)	3 (25)	11 (15,7)	
CPAP**, n (%)					0,286
Não	43 (87,8)	9 (100)	10 (83,3)	62 (88,6)	
Sim	6 (12,2)	0 (0)	2 (16,7)	8 (11,4)	
BIPAP***, n (%)					0,165
Não	49 (100)	9 (100)	11 (91,7)	69 (98,6)	
Sim	0 (0)	0 (0)	1 (8,3)	1 (1,4)	
IOT****, n (%)					0,701
Não	45 (91,8)	8 (88,9)	10 (83,3)	63 (90)	
Sim	4 (8,2)	1 (11,1)	2 (16,7)	7 (10)	
Tempo de suporte ventilatório (dias)					0,604*
média ± DP	0,98 ± 3,04	0,33 ± 1	1,42 ± 2,64	0,97 ± 2,78	
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 14)	0 (0; 3)	0 (0; 7)	0 (0; 14)	
Tempo de Oxigênio (dias)					0,171*
média ± DP	4,67 ± 4,57	2,44 ± 3,61	4,08 ± 4,17	4,29 ± 4,4	
mediana (mín.; máx.)	4 (0; 20)	1 (0; 10)	3 (0; 13)	3,5 (0; 20)	
Internação total (dias)					0,127*
média ± DP	5,8 ± 5,4	2,8 ± 3,9	6,4 ± 6,7	5,5 ± 5,5	
mediana (mín.; máx.)	4,7 (0; 25)	2 (0; 11,3)	4,3 (0; 23)	4,4 (0; 25)	

Teste da razão de verossimilhanças; * Teste Kruskal-Wallis ** CPAP *continuous positive airway pressure* ***BIPAP *bilevel positive airway pressure* ****IOT intubação orotraqueal

6.2. Grupos virais e categorias de gravidade segundo o escore clínico

Levando em consideração a categorização da gravidade em leve, moderada e grave entre os grupos estudados, a infecção isolada por VSR apresentou maior número de casos graves quando comparados aos demais grupos. A infecção única por RV apresentou, em maior proporção, os casos de menor gravidade. Nas codeteccões, tendo o VSR predominado sobre o RV, os casos foram de maior gravidade, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Análise de número e proporção de indivíduos segundo o escore clínico de gravidade e o grupo etiológico

Grupo etiológico	Gravidade segundo escore clínico			Total N(%)
	Baixa N(%)	Moderada N(%)	Grave N(%)	
VSR isolado	12 (24,5)	19 (38,8)	18 (36,7)	49 (100)
VSR > RV	3 (33,3)	2 (22,2)	4 (44,4)	9 (100)
RV > VSR	2 (66,7)	0 (0,0)	1 (33,3)	3 (100)
RV isolado	7 (77,8)	0 (0,0)	2 (22,2)	9 (100)
Total	24 (34,3)	21 (30)	25 (35,7)	70 (100)

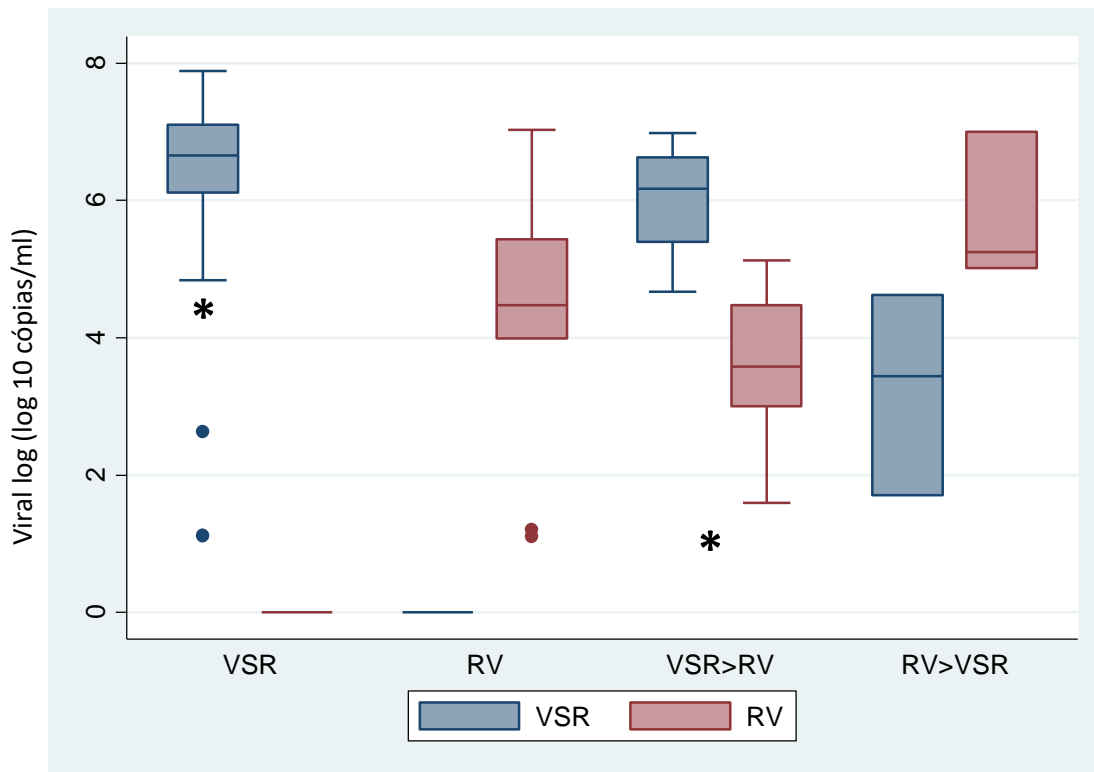
Teste do qui quadrado de Fisher $p=0,020$

6.3. Análise das cargas virais segundo os grupos etiológicos

A mediana da carga viral na infecção isolada por VSR foi maior à dos casos de codeteccão com predomínio de VSR (respectivamente: $6,6 \log_{10}$ cópias/ml x $5,5 \log_{10}$ cópias/ml - $p=0,003$). Na infecção isolada por RV, a mediana da carga viral foi semelhante à dos casos de codeteccão com predomínio de RV (respectivamente: $4,5 \log_{10}$ cópias/ml x $4,4 \log_{10}$ cópias/ml - $p=0,776$).

O Gráfico 1 mostra a distribuição das cargas virais na infecção única por VSR, na infecção única por RV, na codeteccão com predomínio de VSR e na codeteccão com predomínio de RV.

Gráfico 1 - Distribuição das cargas virais nas categorias: infecção única por VSR, infecção única por RV, codeteção com predomínio de VSR, codeteção com predomínio de RV



*Carga viral com significância estatística ($p=0,003$) entre infecção isolada VSR e codeteção VSR>RV

6.4. Análise do tempo decorrido entre o início dos sintomas e a coleta da secreção de nasofaringe

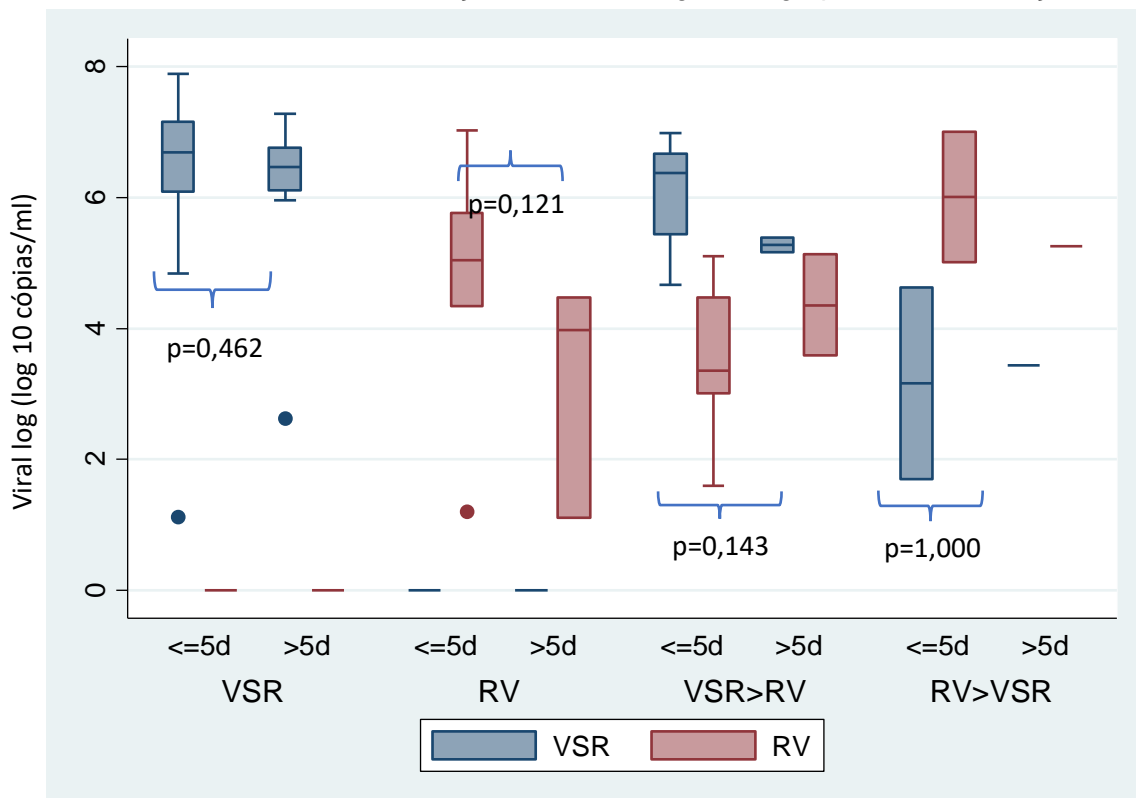
Cerca de 75% das amostras foram coletadas nos primeiros 5 dias de sintomas (média de 4,5 dias). As demais, com uma média de sete dias a partir do início dos sintomas.

A comparação das medianas das cargas virais de infecção única por VSR, dos lactentes que tiveram a amostra de aspirado de nasofaringe coletada com até 5 dias de sintomas e aqueles com mais de 5 dias de sintomas, foram semelhantes ($6,69 \log_{10}$ cópias/ml (6,06 -7,19) x $6,47 \log_{10}$ cópias/ml (6,07 – 6,94), respectivamente - $p=0,462$).

Para os lactentes com infecção única por RV, essa comparação também mostrou resultados semelhantes ($5,04 \log_{10}$ cópias/ml (3,55 – 6,08) x $3,98 \log_{10}$

cópias/ml (1,11 – 4,47), respectivamente - $p=0,121$). Na comparação das medianas das cargas virais do VSR, nas codeteções onde predominou sobre o RV não houve diferença em relação ao dia da coleta da secreção de nasofaringe (6,37 \log_{10} cópias/ml (5,44 -6,67) x 5,27 \log_{10} cópias/ml (5,16 – 5,39), respectivamente – $p=0,143$). Quando o RV predominou sobre o VSR, as medianas de comparação das cargas virais do RV em relação ao dia de coleta também foram semelhantes (6,01 \log_{10} cópias/ml (5,02 -7,00) x 5,25 \log_{10} cópias/ml (5,25 – 5,35) respectivamente - $p=1,000$). O Gráfico 2 mostra a distribuição das cargas virais conforme o tempo decorrido entre sintomas e a coleta de secreção de nasofaringe e os grupos de identificação viral.

Gráfico 2 - Distribuição das cargas virais conforme o tempo decorrido entre o início dos sintomas e a coleta de secreção de nasofaringe e os grupos de identificação viral



6.5. Análise das associações entre cargas virais e desfechos de gravidade

6.5.1. Infecção isolada por VSR

Na análise univariada, a maior carga viral de VSR na infecção única foi associada significativamente aos maiores valores de dias de suporte ventilatório, dias de oxigênio e dias totais de internação. Houve uma tendência a maior tempo de internação em UTI ($p=0,050$). Quando ajustada por idade e dia da coleta da secreção de nasofaringe a partir do início dos sintomas, a análise multivariada mostrou que a maior carga viral de VSR também esteve associada a maior tempo de internação em UTI. A Tabela 5 mostra os resultados encontrados com a aplicação dos modelos lineares generalizados na associação entre etiologia e marcadores de gravidade na bronquiolite.

6.5.2. Infecção isolada por RV

No grupo com infecção por RV, como agente único, a maior carga viral não esteve associada à maior gravidade, tanto na análise univariada como na multivariada. Houve uma tendência a maior tempo de necessidade de oxigênio mas sem significância estatística ($p=0,052$), conforme mostra a Tabela 5

6.5.3 Codetecção VSR com RV

Na codetecção VSR com RV foi considerada a razão VSR/RV de acordo com a carga viral de ambos os vírus. Assim, quanto maior a razão, maior a carga viral do VSR. Tanto na análise univariada como na multivariada, a maior razão VSR/RV esteve associada a maior tempo de administração de oxigênio, conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Modelos Lineares Generalizados da associação entre etiologia e marcadores de gravidade na bronquiolite

Etiologia	Desfecho	Análise bruta			Análise ajustada*				
		Coefficiente**	p	IC95%	Coefficiente**	p	IC95%		
VSR (n=49)	Dias de UTI	1.91	0.050	0.00	3.82	2.03	0.036	0.14	3.93
	Dias de suporte vent	1.78	0.018	0.30	3.25	1.84	0.021	0.28	3.39
	Dias de O2	2.95	0.010	0.69	5.22	2.96	0.011	0.68	5.23
	Dias de internação	3.23	0.014	0.65	5.81	3.23	0.012	0.70	5.75
RV (n=9)	Dias de UTI	1.25	0.276	-1.00	3.50	1.25	0.292	-1.07	3.57
	Dias de suporte vent	0.75	0.276	-0.60	2.10	0.75	0.292	-0.64	2.14
	Dias de O2	4.15	0.052	-0.03	8.33	2.22	0.328	-2.24	6.68
	Dias de internação	4.06	0.093	-0.68	8.79	1.91	0.477	-3.35	7.16
razão (n=12)	Dias de UTI	3.17	0.324	-3.13	9.47	3.59	0.270	-2.78	9.96
	Dias de suporte vent	1.67	0.233	-1.07	4.40	1.91	0.167	-0.80	4.61
	Dias de O2	4.17	0.042	0.15	8.19	4.78	0.017	0.86	8.69
	Dias de internação	5.23	0.122	-1.40	11.85	6.33	0.060	-0.26	12.92

* ajustes para idade (<=28 d; 29-90 d ou >90 d) e tempo entre sintomas e coletas (<=5 d ou >5 d)

** valor médio do aumento (dias) em caso de se ter mais carga viral

LEGENDA: VSR= vírus sincicial respiratório isolado; RV=rinovírus isolado; razão=razão das cargas virais (VSR/RV) nas codeteccções.

As variáveis de carga viral fora dicotomizadas conforme suas medianas

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Este estudo de coorte analisou a importância da quantificação das cargas virais na bronquiolite em lactentes com detecção de VSR e RV e mostrou que a maior carga viral de VSR está associada à maior gravidade nos casos de infecção por um só agente, assim como nas codetecções.

A casuística selecionada inicialmente por critérios clínicos foi representativa da bronquiolite viral aguda em lactentes, com predomínio do sexo masculino e do VSR como agente causal, como também de casos de RV e de codetecção entre ambos. A evolução clínica dos casos incluídos foi compatível com estudos anteriores que analisaram a bronquiolite em lactentes com cerca de 5 dias de internação em média, e aproximadamente 20% de casos graves com necessidade de cuidados intensivos.^{74 75 76}

Nos casos hospitalizados com bronquiolite, a pesquisa etiológica mais frequente na prática clínica é a análise qualitativa, ou seja, a identificação do agente sem que haja quantificação da sua carga viral. Nossos resultados mostraram que a análise qualitativa da pesquisa viral foi insuficiente para diferenciar a gravidade clínica nos diferentes grupos etiológicos segundo os desfechos de gravidade estudados individualmente. Todavia, a utilização do escore de gravidade possibilitou diferenciar os grupos virais, destacando-se o VSR como o agente associado à maior gravidade tanto na infecção isolada, como na codetecção em que foi agente predominante. Esse resultado sugere que, mesmo apenas com a categorização da etiologia em infecção por VSR ou RV, um escore clínico de gravidade pode indicar as infecções por VSR como mais associadas à gravidade que aquelas por RV. O escore de gravidade utilizado nesse estudo foi construído a partir da criação de uma variável latente que considerou dias de internação, necessidade e dias de UTI, necessidade e dias de ventilação mecânica e dias de oxigênio. Esses critérios seguem os parâmetros habitualmente utilizados em estudos clínicos.^{34 35 36 37}

A maior gravidade das infecções pode estar associada às características do hospedeiro, do ambiente e do agente infeccioso e seus mecanismos patogênicos. Também é possível que dependa da quantidade de partículas virais presentes no organismo. Entretanto, esse aspecto ainda permanece controverso na literatura científica. Estudos anteriores^{74 77 12 13 78 79} mostram que cargas

virais maiores à admissão hospitalar influenciam tanto na gravidade do escore clínico como no tempo de internação e necessidade de terapia intensiva, especialmente em relação ao VSR. Porém, contrapontos na literatura têm sido descritos por alguns autores, demonstrando que cargas virais maiores não estão relacionadas a quadros mais graves da bronquiolite.^{60 80 81 70 82 83} Diante dessa controvérsia, a análise da carga viral em cada situação foi detalhadamente analisada.

No presente estudo, a maior carga viral do VSR foi associada a importantes parâmetros que refletem a gravidade do quadro clínico como as maiores frequências de uso de oxigênio, de necessidade de UTI e de ventilação mecânica e, também, à maior duração do suporte ventilatório, da oxigenioterapia e da hospitalização. Os parâmetros que indicaram a maior gravidade relacionada a maior tempo de oxigenioterapia e hospitalização, acrescidos do tempo de internação em UTI, mantiveram-se independentemente significantes, mesmo após os ajustes para a idade e tempo decorrido entre o início dos sintomas e a coleta da secreção de nasofaringe, fatores esses que também podem afetar a gravidade clínica.⁸⁴

Zhou e colaboradores⁷⁸, avaliando a carga viral seriada do VSR, na secreção de nasofaringe, durante a internação de crianças menores de 24 meses com bronquiolite, observaram que os valores à admissão foram maiores (4,4 log 10 cópias/ml) quando comparados aos dias subsequentes até o sétimo dia da internação (3 log₁₀ cópias/ml). El Saleeby e colaboradores⁷⁴ também encontraram diminuição dos valores da carga viral nasal de VSR durante a internação, quando comparados ao primeiro dia (4,63 ± 0,13 log unidade formadoras de placa (PFU) / mL) em relação ao segundo dia (3,63 ± 0,18 log PFU / mL) e terceiro dia de internação (2,91 ± 0,33 log PFU / mL). Em seu estudo, cargas virais maiores do VSR estiveram relacionadas com maior tempo de hospitalização e necessidade de terapia intensiva. Nestes estudos, independentemente da queda da carga viral durante a internação (cerca de 0,4 a 1 log PFU / mL), as maiores cargas virais na admissão estiveram associadas à gravidade durante a hospitalização. Isto pode ser corroborado pelo estudo multicêntrico de Hasegawa et al.¹², que incluiu mais de 2000 crianças menores de 2 anos com bronquiolite, que mesmo utilizando a carga viral semiquantitativa (cycle threshold – Ct) para analisar a secreção de nasofaringe nas primeiras 24

horas de admissão hospitalar, observou que a maior carga viral do VSR esteve relacionada ao maior tempo de internação (superior a 3 dias) e maior risco de internação em UTI.

No presente estudo não foi realizada a pesquisa seriada de carga viral. Isso não modificou a interpretação dos resultados, uma vez que o tempo de coleta não interferiu na carga viral e na gravidade, conforme mostraram os ajustes feitos na análise multivariada. Considerando que o pico dos sintomas da bronquiolite geralmente ocorre entre o terceiro e o quinto dia da doença, o fato pode explicar a não variação da carga viral. O que corrobora esta possibilidade é o estudo de DeVincenzo et al.⁸⁵, que inoculou VSR através de gotas intranasais em adultos saudáveis entre 19 e 45 anos. O aumento da carga viral ocorreu entre o sexto e sétimo dia da inoculação e o pico da carga viral ocorreu com 1,17 dias após o pico dos sintomas.

Importante ressaltar que a associação entre gravidade e carga viral não foi observada nas infecções por RV como agente único. De fato, não há um consenso na literatura em relação à correlação da carga viral do RV e a gravidade da doença.^{37 81 86} Alguns autores^{81 86} não encontraram associações entre carga viral e tempo de internação e necessidade de UTI em crianças infectadas pelo RV. Uma das possíveis explicações seria que, em relação à gravidade clínica, a resposta imune do hospedeiro, assim como o genótipo do RV envolvido na infecção, seriam mais importantes que a carga viral^{36 86}. Muito se tem discutido em relação à diferença na patogênese entre os diversos sorotipos do RV.^{36 87} Enquanto o RV A e o RV B ligam-se à molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e ao receptor de lipoproteína de baixa densidade(LDLR)³⁶, o RV C tem como receptor celular uma proteína de alta expressão no epitélio respiratório, denominada proteína membro da família 3 relacionado com caderina (CDHR3), primeiramente implicada na exacerbação da asma. Um polimorfismo de nucleotídeo único (C529Y) em CDHR3 estaria associado à suprarregulação de receptores na superfície celular, promovendo a replicação viral e consequente aumento da carga viral.⁸⁷ Para Takeyama et al.⁸⁸, a carga viral do RV estaria relacionada à maior gravidade, principalmente, nos maiores de 11 meses de idade, ao passo que nos mais jovens a maior gravidade estaria relacionada à resposta imune e ao menor calibre das vias aéreas. Em contrapartida, Xiao et al.³⁶ encontraram diferenças na gravidade em relação ao

RV A e ao RV C. Os quadros mais graves foram observados nas crianças com infecção com RV A, com carga viral maior que 10^6 cópias/ml e abaixo de 23 meses de idade, ao passo que essa diferença não foi observada nas crianças com infecção pelo RV C. Diferentemente, Lauinger et al.⁸⁹ observaram maior gravidade do RV C em crianças menores de 3 anos de idade. Não há, porém, um consenso sobre qual seria a carga viral do RV para causar gravidade. Gerna et al.⁹⁰ observaram que cargas virais de RV A superiores a 10^6 cópias/ml foram responsáveis por maior gravidade, muito próximo ao encontrado por Piralla et al.⁹¹, que relataram maior gravidade do RV com carga viral maior que 10^7 cópias/ml em crianças menores de 5 anos de idade. Outro fator que poderia interferir na gravidade do RV seriam as amostras do trato respiratório superior podendo não refletir as condições do trato respiratório inferior, com as células epiteliais das vias aéreas nasais podendo responder de forma diferente das células epiteliais brônquicas às infecções por RV.⁸⁶

O presente estudo não incluiu a análise de cargas virais segundo os sorotipos de RV. Ressalta-se a tendência à associação entre a maior carga viral na infecção única por RV e o maior tempo de oxigenioterapia, segundo a análise univariada, porém sem significância estatística e não persistente após ajustes realizados na análise multivariada.

As codeteccções de vírus respiratórios são frequentes nas infecções de vias aéreas inferiores em lactentes podendo chegar até a 40% dos casos.^{36 37 92 62 93} Vários aspectos associados às codeteccções também permanecem incertos na literatura científica. Num estudo multicêntrico que avaliou crianças com bronquiolite durante um período de 3 anos, o tempo de internação foi maior naquelas com codeteccção por VSR e RV. Entretanto, não houve diferença na admissão em UTI ou na necessidade de suporte ventilatório.⁹⁴ Dados semelhantes foram encontrados por Chorazy e colaboradores⁹⁵, que não encontraram risco aumentado de internação em UTI em crianças hospitalizadas com múltiplos vírus identificados. Por outro lado, outros autores^{37 96} encontraram maior gravidade nos pacientes menores de 2 anos de idade com codeteccção VSR e RV, com maior tempo de internação e maior necessidade de oxigenioterapia. No estudo de Skjerven e colaboradores¹³, a maior carga viral de VSR, na codeteccção VSR com RV, teve relação com maior tempo de internação. Na revisão sistemática, realizada por Scotta e colaboradores⁹³, sobre gravidade

das coinfeções virais em mais de 17.000 crianças, não houve influência sobre os desfechos de gravidade analisados como tempo médio de permanência, tempo de oxigênio suplementar, necessidade de hospitalização, necessidade de internação em terapia intensiva, ventilação mecânica e óbito.

No presente estudo, nas codeteções, o predomínio de VSR também se mostrou associado à maior gravidade, nesse caso, devido à maior frequência do uso de oxigênio, como observado por Rodrigues e colaboradores.⁹⁶ Essa informação, acrescida aos resultados encontrados na infecção por um único agente, sugere que os mecanismos patogênicos envolvidos na bronquiolite por VSR associam-se a quadros mais graves que a bronquiolite por RV. Uma possível explicação seria uma competição entre os mecanismos patogênicos dos vírus.^{97 98 99} O VSR é um vírus de crescimento mais lento quando comparado ao RV. Contudo, quando há um retardo no início da infecção pelo RV, o VSR pode bloquear a sua replicação, tornando-o um espectador da infecção com consequente diminuição da carga viral.^{98 90} Outra explicação seria que o interferon produzido pelo VSR causaria uma inibição da infecção por RV, inibindo a intensidade da sua manifestação.^{97 100} A interferência entre dois agentes virais foi demonstrada, também, em modelos de células de camundongos infectados, primeiramente, com rinovírus e, após dois dias, com influenza A. Houve uma resposta atenuada à infecção por influenza com manifestação menos grave da doença. Isso sugere que a infecção anterior por RV alterou a resposta do hospedeiro e que o momento e a ordem da infecção no hospedeiro podem ser importantes para a manifestação da doença.¹⁰¹

Diversos fatores podem influenciar a carga viral na bronquiolite como idade, genótipo do vírus e resposta das citocinas próinflamatórias produzidas na ativação da resposta imune inata, além da expressão gênica viral nas células mononucleares e a sua relação com o microbioma.^{102 45 54 103 34} Este último vem despertando o interesse na literatura, especialmente no que diz respeito à codeteção vírus-bactéria, que pode determinar formas graves da pneumonia adquirida na comunidade, como ocorre na interação entre o vírus Influenza com o *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* e consequente falha no tratamento. Estudos em modelos animais sugerem que os vírus respiratórios podem propiciar o crescimento bacteriano, aumentando a sua infectividade ou a sua adesão pela alteração da estrutura da membrana celular.⁹⁵

A influência da idade na gravidade da bronquiolite é bem descrita na literatura^{104 69 105 63}. O aumento da carga viral em crianças menores, com consequente apresentação clínica mais grave, poderia estar associada a fatores indiretos como exposição a contactantes infectados, sorotipo do vírus, imaturidade do sistema imune. No entanto, este estudo não mostrou diferença da carga viral quando considerados os grupos etários ≤ 28 dias, entre 29 dias e 90 dias e mais de 90 dias, tanto para as infecções únicas como para a codeteção VRS com RV. O mesmo se dá em relação à gravidade, quando realizada a análise multivariada, o que vai de encontro ao descrito por alguns autores.^{77 88 106} Uma das possibilidades para explicar esse resultado seria a presença da IgG materna transplacentária, especialmente para o VSR, cujos níveis circulantes mais elevados estão presentes até o terceiro mês de vida⁸⁴. Nas crianças menores de 4 meses de vida, a redução da produção de citocinas pelos monócitos (TNF alfa), pelas células Th1 (INF gama) e células Th2 (IL-4), confere um papel protetor antiinflamatório¹⁰⁷ e equilíbrio da resposta inflamatória excessiva.⁵⁴ Feikin et al.¹⁰⁶, estudando pneumonias em crianças entre 1 e 59 meses de idade, observaram uma tendência à queda da carga viral conforme o aumento da idade, tanto para o VSR quanto para o adenovírus. Para o RV, ao contrário, houve uma tendência de aumento da carga viral quanto maior a idade.

A influência dos genótipos sobre a carga viral e a gravidade da bronquiolite é descrita por alguns autores e continua controversa.^{22 108 79} Para Midulla et al.²², a carga viral do genótipo VSR BA teve correlação com maior necessidade de dias de oxigênio suplementar, diferentemente dos genótipos NA1 e ON1. Para Kadji et al.¹⁰⁹, crianças menores de 6 meses de idade com pneumonia por VSR tiveram carga viral maior do genótipo NA1 nos primeiros 4 dias do início dos sintomas em relação aos genótipos ON1 e BA provavelmente pelas características estruturais destes sorotipos, como inserções e duplicações do gene G, que poderiam afetar a eficiência da replicação do VSR. Quanto ao RV, Xiao et al.³⁶ constataram que a carga viral da infecção isolada por RV foi maior nas crianças com doenças graves por RV A do que para o sorotipo C. Neste estudo não foi realizada a sorotipagem do VSR, mas, independentemente do sorotipo, houve uma maior gravidade no grupo onde o VSR esteve presente. Em estudo anteriormente realizado por nosso grupo¹¹⁰, que analisou a casuística total do estudo matriz (do qual foram selecionados os participantes do presente

estudo), o genótipo HVSR AON1 não foi associado a características clínicas específicas distinguíveis de outros genótipos.¹¹⁰

Dentro da controvérsia atual quanto à influência da carga viral sobre a gravidade da bronquiolite^{60 80 81 70 82 83}, Garcia-Mauriño⁸⁰ postulou que cargas virais maiores de VSR estão associados à doença menos grave devido a uma resposta imune mais robusta, com clareamento viral mais rápido e diminuição da progressão da doença. Em seu estudo avaliou a carga viral do VSR em 150 crianças menores de 2 anos, tanto ambulatoriais quanto hospitalizadas. Observou que a carga viral do VSR foi maior nas crianças não internadas comparadas às crianças internadas em enfermaria ou UTI ($p=0,003$). Na mesma linha de observação, Piedra et al.⁷⁰ descreveram que a maior carga viral, no início da doença, poderia estimular a resposta imune inata com resolução mais rápida da doença e evolução menos grave devido à produção de citocinas protetoras, como a IP-10 (quimiocina que induz a resposta celular Th1) e a IL-17 (importante mediador inflamatório). Um dado interessante no seu estudo é que maiores cargas virais poderiam ter um efeito protetor devido à produção de genoma viral defeituoso, o que levaria ao erro da replicação viral e diminuição da carga viral. Vários autores^{82 83 111} mostraram a importância das citocinas pró-inflamatórias para a apresentação menos grave na bronquiolite com maior carga viral. Especialmente, as citocinas produzidas pelas células Th1.

Thwaites et al.⁸² encontraram níveis mais elevados de CXCL10/IP-10, INF γ , CCL5/RANTES nos casos moderados de bronquiolite com maior carga viral do VSR quando comparado aos quadros mais graves e com mesmo tempo de duração dos sintomas. Para Bennett et al.⁸³, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, especialmente a IL-10, foram inversamente associados com a duração da necessidade de oxigênio. No estudo de Nicholson et al.¹¹¹, as crianças ambulatoriais com infecção isolada por VSR tiveram aumento do INF γ , IL-4, IL-15, IL-17 IP-10 e eotaxina quando comparadas às crianças hospitalizadas. Contrariamente, na infecção isolada por RV, esta associação não foi observada. No grupo codeteção, níveis de IP-10 estiveram presentes em níveis maiores no grupo não hospitalizado. Tanto a IL-17, como a IL-4, a IP-10 e o INF γ , tiveram associação com a não hospitalização. Estes dados sugerem uma resposta vírus específica, mais do que uma resposta inflamatória generalizada do hospedeiro ao vírus.

Estes achados vêm de encontro ao estudo de DeVincenzo et al.⁸⁵ que, apesar de ter sido realizado em adultos dos 19 aos 45 anos através da inoculação de gotas nasais contendo VSR, não sustentou a teoria da resposta Th2, encontrando níveis baixos de IL-4 e IL-10 nos casos mais graves. As citocinas IL-6 e IL-8, dosadas na mucosa nasal, estiveram correlacionadas com a gravidade da doença e com a carga viral. A ressalva para este estudo foi a sua realização em indivíduos adultos, os quais têm uma certa quantidade de anticorpos neutralizadores nos fluidos epiteliais do trato respiratório inferior que pode limitar a replicação do VSR e a manifestação da doença.

Por outro lado, alguns autores consideram que quanto maior a carga viral, maior a amplificação da resposta imune, do insulto do epitélio respiratório, do processo inflamatório (com recrutamento e ativação dos leucócitos e extravasamento local de proteínas plasmáticas) e da lesão pulmonar. Portanto, mais grave a apresentação clínica com necessidade de suporte ventilatório, oxigênio e tempo de internação mais prolongado. O predomínio da resposta Th2 sobre a Th1 seria um dos motivos para a exacerbação do processo inflamatório e diminuição da depuração viral, pela ação das interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10 em detrimento da produção de interferon gama (INF γ) e IL-12 pelos macrófagos e células dendríticas^{33 112}.

As análises apontadas neste estudo estão de acordo com outros resultados anteriores, que associaram cargas virais maiores de VSR à maior gravidade da doença em lactentes hospitalizados. Não foi realizada a análise da resposta imunológica, o que pode, em estudos futuros, contribuir para esclarecimento da influência da carga viral sobre a gravidade clínica.

Considerando a importância da carga viral, medidas de isolamento, evitar aglomeração intra e extradomiciliar e contato com contactantes infectados contribuem para a contenção do vírus e da sua disseminação. Durante a pandemia do COVID-19 (coronavirus disease -19), no ano de 2020, o isolamento social tem mostrado uma diminuição muito expressiva da ocorrência da síndrome respiratória aguda grave (SRAG) causada pelo Influenza vírus e VSR. Dados do Ministério da Saúde¹¹³, do ano de 2019, apontam que 18% dos casos internados por SRAG tiveram como agente principal o vírus Influenza (H1N1 em 60% dos casos) seguido por outros vírus em 23% dos casos, destacando-se, neste último, o VSR como o principal agente (70% dos casos). No ano de 2020,

com a pandemia COVID-19, observa-se uma queda expressiva, com menos de 1% dos casos de SRAG relacionados a estes agentes virais. Até a semana epidemiológica 40, o coronavírus pandêmico (SARS-CoV-2) foi responsável por 54% das SRAG, enquanto o vírus influenza e outros vírus respiratórios estiveram presentes em 0,3% e 0,4% dos casos, respectivamente. Nas crianças menores de 1 ano de idade, o vírus Influenza foi identificado em 0,02% dos casos e outros vírus respiratórios em 0,1% dos casos de SRAG¹¹⁴, reafirmando o impacto do isolamento social sobre a incidência desses vírus nas infecções agudas de vias aéreas inferiores e suas manifestações graves.

7.1. Limitações do estudo

A amostra deste estudo foi representativa da gravidade na infecção única causada pelo VSR ou na codeteção onde houve o seu predomínio. Algumas limitações são ressaltadas:

- ✓ A análise da carga viral, na admissão das crianças previamente híidas hospitalizadas com bronquiólite, não considerou as cargas virais seriadas durante a internação e nem a sua correlação com a evolução clínica. No entanto, o ajuste para o tempo decorrido entre a coleta de secreção de nasofaringe e o início dos sintomas mostrou que esse aspecto não foi relevante na análise dos resultados.
- ✓ As análises dos diferentes sorotipos de VSR e RV e a sua possível relação com as cargas virais e desfechos de gravidade não foram objetivos deste estudo. Essa análise foi limitada pelo número de amostras positivas, podendo ser explorada em futuros estudos
- ✓ Foram excluídas crianças com comorbidades, o que limita a extrapolação dos resultados dos lactentes previamente híidos.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

1. O VSR foi o vírus mais detectado nos lactentes hospitalizados por bronquiolite. A maior frequência foi da infecção única por VSR, seguida das codeteccões VSR e RV e da infecção única por RV. As características demográficas e clínicas foram semelhantes entre lactentes com infecção isolada por VSR, por RV ou nas codeteccões VSR com RV.
2. O tempo decorrido entre o início dos sintomas e a coleta da secreção nasofaríngea foi semelhante entre os grupos comparados.
3. As cargas virais de VSR foram maiores nos casos de infecções únicas comparadas às codeteccões e comparada às cargas virais de RV, tanto em infecções únicas como nas codeteccões
4. A gravidade da infecção única pelo VSR esteve associada à maior necessidade de UTI, ventilação mecânica, maior tempo de oxigênio e dias de internação mesmo depois de ajustados para os fatores de idade e dias de coleta de secreção nasofaríngea entre início dos sintomas e admissão hospitalar. As maiores cargas virais de RV associaram-se à menor gravidade clínica tanto na infecção isolada como na codeteccão onde o RV predominou. Nas codeteccões nas quais houve predomínio de VSR sobre RV, o tempo de oxigênio foi mais prolongado.

ANEXOS

9. ANEXOS

Anexo A

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

HOSPITAL UNIVERSITARIO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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 : SEXO: M | F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA "ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM
CELULAS MONONUCLEARES DE LACTENTES HOSPITALIZADOS COM INFECÇÃO POR VIRUS
SINCICIAL RESPIRATÓRIO EM CRIANÇAS"

PESQUISADOR:

Sandra E. Vieira

CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor do Departamento de Pediatria da FMSUP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 57724

UNIDADE DO HCFMUSP: Departameto de Pediatria

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 : 24 meses

**REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE
LEGAL SOBRE A PESQUISA**

Você e seu filho (a) estão sendo convidados para participar do estudo "Análise do perfil de expressão gênica em células mononucleares de lactentes hospitalizados com infecção por vírus sincicial respiratório". A infecção causada pelo vírus sincicial respiratório é frequente em crianças nos primeiros anos de vida e pode levar a hospitalização quando mais grave. O estudo das características genéticas da criança podem colaborar para entender melhor a doença e para o desenvolvimento de vacinas e outras formas de prevenção e tratamento. Neste estudo serão realizadas coletas de secreção através do nariz da criança para identificar e analisar o vírus e coleta de uma amostra de sangue da criança. Os pesquisadores farão perguntas sobre o ambiente onde a criança vive e sobre os sintomas respiratórios que ela apresenta. Os riscos ao paciente decorrentes destes exames são mínimos pois são coletas de secreção através do nariz e da coleta de sangue.

Você receberá orientações de como diminuir os riscos de adquirir infecções respiratórias em geral e como evitar agravantes da infecção respiratória.

É garantida a sua liberdade de retirada deste consentimento a qualquer momento. O seu atendimento, assim como o de seu filho, serão realizados normalmente no Hospital Universitário, mesmo que a você não aceite participar desta pesquisa ou que deseje sair da pesquisa após seu início.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados da pesquisa que sejam do conhecimento dos pesquisadores. A assistência no Hospital Universitário da USP, estará disponível para eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Não há despesas pessoais adicionais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

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

O principal investigador, neste estudo, é a Dra Sandra E. Vieira que pode ser encontrada no Hospital Universitário da USP - Av. Lineu Prestes 2565 – Telefone: 3091 9404. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – no mesmo endereço, telefone 3091 xxxx, email:@hu.usp.br

Sandra E. Vieira – 3091 9409

Av. Dr. Lineu Prestes – Cidade Universitária – SP – SP - CEP 05403-000

Comissão de Ética do Hospital Universitário da USP

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito do que li ou do que foi lido para mim, descrevendo a pesquisa : "Análise do perfil de expressão gênica em células mononucleares de lactentes hospitalizados com infecção por vírus sincicial respiratório". Eu discuti com a Dra Sandra Vieira ou com seu substituto, também participante da pesquisa, sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de sigilo e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de atendimento no sistema de saúde, independente de minha participação na pesquisa. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

(Para casos de pais menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

Anexo B**PROJETO PEG - VSR****CHECK LIST PARA INCLUSÃO DE PACIENTES**

Nome: _____

RH: _____ N.Atendimento: _____

Data: _____

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Idade entre 0 e 6 m29d ()SIM ()NÃO

Diagnostico de bronquiolite/infecção viral de vias aéreas suspeita ou confirmada ()SIM()NÃO

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Prematuridade ()SIM ()NÃO

Outra infecção atual (ou suspeita) além da infecção viral () SIM ()NÃO

Doença Pulmonar () SIM () NÃO

Doença Cardíaca () SIM () NÃO

Outra comorbidade () SIM () NÃO

SE VOCÊ PREENCHEU SIM PARA TODOS OS CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E NÃO PARA TODOS OS CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO O PACIENTE PODE SER INCLUIDO NO ESTUDO

Paciente incluído () SIM ()NÃO

Se sim : número do caso:_____

POR FAVOR, APLIQUE O TCLE

Anexo C**Protocolo Clínico**

Nome: _____

RH _____ N. Atendimento _____

D. Nasc. __/__/__ sexo: _____ cor: _____

D. Admissão __/__/__

Local da internação inicial/tempo de permanência

- Pronto socorro _____
- Enfermaria _____
- UTI _____
- Berçário _____

Diagnóstico admissional: _____

Diagnóstico de alta: _____

História clínica	Duração
Tosse <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
Coriza <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
Febre <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
Obstrução nasal <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
Espirros <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
Chiado no peito <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
Cansaço <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
Conjuntivite <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
Cianose <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
Apnéia <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
Peito cheio <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
Aceitação alimentar <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> prejudicada	
Vômitos pós tosse <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
Contato com GRIPE OU RESFRIADO <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n grau de parentesco do contato:	
Imunização completa <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n Vacinação p/ influenzae 2012/2013 <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n Palivizumab <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n	
freqüenta creche <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n numero de pessoas em casa < 2 anos: _____ 2-12 anos : _____ 12-18 anos: _____ tabagismo passivo <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n se sim: número de fumantes em casa: _____ desmame precoce <input type="checkbox"/> s <input type="checkbox"/> n se sim : idade do desmame: _____	

Quadro clínico inicial:	
FR	
FC	
Perfusão Periférica	
Dispneia	
Cor	
Nível de consciência	
Saturação de O2	
Ausulta pulmonar	
Outros	

Exames laboratoriais

Data	Exame	Resultado

Pesquisa viral em aspirado de nasofaringe

Data	Resultado

Exames radiológicos

Data	Exame	Resultado

Tratamento

	Quais	Via	Tempo	Motivo da suspensão	Tempo após resultado da pesquisa viral
Antibiótico					
Broncodilatador					
Corticóide					
Outros					

Complicações infecciosas / data do diagnóstico (dias após internação)

- Otite média aguda / _____
- Pneumonia intra-hospitalar / _____
- Pneumonia aspirativa / _____
- Outras _____ / _____

Tempo de O2

- Nebulização _____
- Tenda _____
- Venturi _____
- CPAP _____
- BIPAP _____
- Ventilação mecânica _____

Nutrição (dias)

- Pausa _____
- Sonda _____
- VO _____
- NPP _____

Data da Alta : ___/___/___

Medicações de alta: _____

Encaminhamentos: _____

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. TabNet: morbidade hospitalar do SUS por local de internação, Brasil [Internet]. Brasília (DF): DATASUS; 2008-2020 [citado 14 out 2020]. [Internet]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>.
2. Jain S, Williams DJ, Arnold SR, Ampofo K, Bramley AM, Reed C, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children. *N Engl J Med*. 2015;372(9):835–45.
3. World Health Organization. Revised WHO classification and treatment of pneumonia in children at health facilities: evidence summaries [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2014. [cited 2020 Oct. 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK264162/>. 2014.
4. World Health Organization. Pneumonia [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2020 [cited 2020 Oct 14]. Available from: https://www.who.int/health-topics/pneumonia#tab=tab_1
5. World Health Organization. Influenza: battle against respiratory viruses (BRaVe) initiative [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2020 [cited 2020 Oct. 14]. Available from: https://www.who.int/influenza/patient_care/clinical/brave/en/
6. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus Infection in young children. *N Engl J Med*. 2009;360(6):588–98.
7. Van de Steen O, Miri F, Gunjaca M, Klepac V, Gross B, Notario G, et al. The burden of severe respiratory syncytial virus disease among children younger than 1 year in Central and Eastern Europe. *Infect Dis Ther*. 2016;5(2):125–37.
8. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, Alverson BK, Baley JE, Gadomski AM, et al. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics* [Internet]. 2014 [cited 2020 Oct. 14];134(5):e1474–502. Available from:

<http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2014-2742>

9. Pelletier AJ, Mansbach JM, Camargo Jr CA. Direct medical costs of bronchiolitis hospitalizations in the United States. *Pediatrics*. 2006;118(6):2418–23.
10. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;45(3):331–79.
11. Ghazaly M, Nadel S. Characteristics of children admitted to intensive care with acute bronchiolitis. *Eur J Pediatr*. 2018;177(6):913–20.
12. Hasegawa K, Jartti T, Mansbach JM, Laham FR, Jewell AM, Espinola JA, et al. Respiratory syncytial virus genomic load and disease severity among children hospitalized with bronchiolitis: multicenter cohort studies in the United States and Finland. *J Infect Dis*. 2015;211(10):1550–9.
13. Skjerven HO, Megremis S, Papadopoulos NG, Mowinckel P, Carlsen KH, Lødrup Carlsen KC. Virus type and genomic load in acute bronchiolitis: severity and treatment response with inhaled adrenaline. *J Infect Dis*. 2016;213(6):915–21.
14. Stein RT, Bont LJ, Zar H, Polack FP, Park C, Claxton A, et al. Respiratory syncytial virus hospitalization and mortality: systematic review and meta-analysis. *Pediatr Pulmonol*. 2017;52(4):556–69.
15. Manzoni P, Figueras-Aloy J, Simões EAF, Checchia PA, Fauroux B, Bont L, et al. Defining the incidence and associated morbidity and mortality of severe respiratory syncytial virus infection among children with chronic diseases. *Infect Dis Ther*. 2017;6(3):383–411.
16. Haq IJ, Battersby AC, Eastham K, McKean M. Community acquired pneumonia in children. *BMJ*. 2017;356:1–10.
17. Franz A, Adams O, Willems R, Bonzel L, Neuhausen N, Schweizer-Krantz S, et al. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *J Clin Virol* [Internet]. 2010 [cited 2020 Oct. 14];48(4):239–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2010.05.007>

18. Ricart S, Marcos MA, Sarda M, Anton A, Muñoz-Almagro C, Pumarola T, et al. Clinical risk factors are more relevant than respiratory viruses in predicting bronchiolitis severity. *Pediatr Pulmonol*. 2013;48(5):456–63.
19. Luchsinger V, Ampuero S, Palomino MA, Chnaiderman J, Levican J, Gaggero A, et al. Comparison of virological profiles of respiratory syncytial virus and rhinovirus in acute lower tract respiratory infections in very young Chilean infants, according to their clinical outcome. *J Clin Virol*. 2014;61(1):138–44.
20. García-García ML, Calvo C, Pozo F, Villadangos PA, Pérez-Breña P, Casas I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-acquired pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(8):808–13.
21. Machado DBB. Identificação e caracterização molecular do vírus sincicial respiratório humano em crianças com infecções respiratórias de 2006 a 2010 [Dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Oswaldo Cruz; 2012.
22. Midulla F, Nenna R, Scagnolari C, Petrarca L, Frassanito A, Viscido A, et al. How respiratory syncytial virus genotypes influence the clinical course in infants hospitalized for bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2019;219(4):526–34.
23. Rossi, G. A., Colin AA. Respiratory syncytial virus-Host interaction in the pathogenesis of bronchiolitis and its impact on respiratory morbidity in later life. *Pediatr Allergy Immunol*. 2017;28(4):320–31.
24. Pecchini R, Berezin EN, Felício MC, Passos SD, Souza MC, Lima LR, et al. Incidence and clinical characteristics of the infection by the respiratory syncytial virus in children admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. *Brazilian J Infect Dis*. 2008;12(6):476–9.
25. Vieira SE, Stewien KE, Queiroz DA, Durigon EL, Török TJ, Anderson LJ, Miyao CR, et al. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo* [Internet]. 2001 [cited 2020 Oct. 14];43(3):125–31. Available from: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652001000300002.

26. Moura FEA, Borges LC, Souza LSF, Ribeiro DH, Siqueira MM, Ramos EAG. Estudo de infecções respiratórias agudas virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). *J Bras Patol e Med Lab.* 2003;39(4):275–82.
27. Munywoki PK, Koech DC, Agoti CN, Kibirige N, Kipkoech J, Cane PA, et al. Influence of age, severity of infection, and co-infection on the duration of respiratory syncytial virus (RSV) shedding. *Epidemiol Infect.* 2015;143(4):804–12.
28. Gerna G, Campanini G, Rognoni V, Marchi A, Rovida F, Piralla A, et al. Correlation of viral load as determined by real-time RT-PCR and clinical characteristics of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections in early infancy. *J Clin Virol.* 2008;41(1):45–8.
29. Golan-tripto I, Goldbart A, Akel K, Dizitzer Y, Novack V, Tal A. Modified Tal Score: validated score for prediction of bronchiolitis severity. *Pediatr Pulmonol.* 2018;53:796–801.
30. Justicia-grande AJ, Martínón-Torres F. The ReSVinet score for bronchiolitis: a scale for all seasons. *Am J Perinatol.* 2019;36(Suppl 02):S48–53.
31. Tal A, Bavilski C, Yohai D, Bearman JE, Gorodischer R, Moses SW. Dexamethasone and salbutamol in the treatment of acute wheezing in infants. *Pediatrics.* 1983;71(1):13–8.
32. Lowell DI, Lister G, Von Koss H, McCarthy P. Wheezing in infants: the response to epinephrine. *Pediatrics.* 1987;79(6):939–45.
33. García C, Soriano-Fallas A, Lozano J, Leos N, Gomez AM, Ramilo O, et al. Decreased innate immune cytokine responses correlate with disease severity in children with respiratory syncytial virus and human rhinovirus bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(1):86–9.
34. Rodriguez-Fernandez R, Tapia LI, Yang CF, Torres JP, Chavez-Bueno S, Garcia C, et al. Respiratory syncytial virus genotypes, host immune profiles, and disease severity in young children hospitalized with bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2018;217(1):24–34.

35. Mella C, Suarez-Arrabal MC, Lopez S, Stephens J, Fernandez S, Hall MW, et al. Innate immune dysfunction is associated with enhanced disease severity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2013;207(4):564–73.
36. Xiao Q, Zheng S, Zhou L, Ren L, Xie X, Deng Y, et al. Impact of human rhinovirus types and viral load on the severity of illness in hospitalized children with lower. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(11):1187–92.
37. Comte A, Bour J, Darniot M, Pitoiset C, Aho-Glélé LS, Manoha C. Epidemiological characteristics and clinical outcomes of human rhinovirus infections in a hospitalized population: severity is independently linked to RSV coinfection and comorbidities. *J Clin Virol* [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct. 15];125:104290. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104290>
38. Lee N, Lui GC, Wong KT, Li TC, Tse EC, Chan JY, et al. High morbidity and mortality in adults hospitalized for respiratory syncytial virus infections. *Clin Infect Dis.* 2013;57(8):1069–77.
39. Gurgel RQ, Bezerra PG, Duarte Mdo C, Moura AÁ, Souza EL, Silva LS, et al. Relative frequency, possible risk factors, viral codetection rates, and seasonality of respiratory syncytial virus among children with lower respiratory tract infection in Northeastern Brazil. *Med. (Baltimore)* 2016;95(15):1–8.
40. Smyth RL, Mobbs KJ, Hea UO, Ashby D, Hart CA. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: disease severity, interleukin-8, and virus genotype. *Pediatr Pulmonol.* 2002;33(5):339–46.
41. Walsh EE, Mcconnochie KM, Long CE, Hall CB. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J Infect Dis.* 1997;175(4):814–20.
42. Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis.* 2002;186(6):839–42.
43. Fletcher JN, Smyth RL, Thomas HM, Ashby D, Hart CA. Respiratory

- syncytial virus genotypes and disease severity among children in hospital. *Arch Dis Child*. 1997;77(6):508–11.
44. Mejias A, Dimo B, Suarez NM, Garcia C, Suarez-Arrabal MC, Jartti T, et al. Whole blood gene expression profiles to assess pathogenesis and disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection. *PLoS Med*. 2013;10(11):e1001549.
 45. Vieira SE, Bando SY, de Paulis M, Oliveira DBL, Thomazelli LM, Durigon EL, et al. Distinct transcriptional modules in the peripheral blood mononuclear cells response to human respiratory syncytial virus or to human rhinovirus in hospitalized infants with bronchiolitis. *PLoS One*. 2019;14(3):1–19.
 46. Correia FA. *Estudo molecular da epidemiologia da infecção por Rhinovirus na região do Grande Porto* [Dissertação]. Porto: Universidade Fernando Pessoa; 2011.
 47. Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):135–62.
 48. Cox DW, Le Souëf PN. Rhinovirus and the developing lung. *Paediatr Respir Rev*. 2014;15(3):268–74.
 49. Leotte J, Trombetta H, Faggion HZ, Almeida BM, Nogueira MB, Vidal LR, et al. Impact and seasonality of human rhinovirus infection in hospitalized patients for two consecutive years. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2017 [cited 2020 Oct. 15];93(3):294–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpdp.2016.12.002>
 50. Moreira LP, Watanabe ASA, Camargo CN, Melchior TB, Granato C, Bellei N. Respiratory syncytial virus evaluation among asymptomatic and symptomatic subjects in a university hospital in São Paulo, Brazil, in the period of 2009-2013. *Influenza Other Respi Viruses*. 2018;12(3):326–30.
 51. Monteiro AIMP, Bellei NCJ, Sousa AR, dos Santos AMN, Weckx LY. Infecções respiratórias em crianças menores de dois anos de idade submetidas a profilaxia com palivizumabe. *Rev Paul Pediatr*. 2014;32(2):152–8.

52. González, P. A., Bueno, S. M., Carreño, L. J., Riedel, C. A., Kalergis AM. Respiratory syncytial virus infection and immunity. *Rev Med Virol.* 2012;22(4):230–44.
53. Mahony JB, Petrich A, Smieja M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2011;48(5–6):217–49.
54. Heinonen S, Jartti T, Garcia C, Oliva S, Smitherman C, Anguiano E, et al. Rhinovirus detection in symptomatic and asymptomatic children value of host transcriptome analysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(7):772–82.
55. Greer RM, McErlean P, Arden KE, Faux CE, Nitsche A, Lambert SB, et al. Do rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract infections? *J Clin Virol.* 2009;45(1):10–5.
56. Appak Ö, Duman M, Belet N, Sayiner AA. Viral respiratory infections diagnosed by multiplex polymerase chain reaction in pediatric patients. *J Med Virol.* 2019;91(5):731–7.
57. Corvalán LP, Arias BG, Morales SP, González MR, Inostroza SJ, Fuenzalida IL. Inmunofluorescencia indirecta versus reacción de polimerasa en cadena para el diagnóstico de virus respiratorios en niños ingresados en un hospital de la Región Metropolitana. *Rev Chil infectología.* 2019;36(1):26–31.
58. Damasio GA, Pereira LA, Moreira SD, Duarte dos Santos CN, Dalla-Costa LM, Raboni SM. Does virus-bacteria coinfection increase the clinical severity of acute respiratory infection? *J Med Virol.* 2015;87(9):1456–1461.
59. Lim FJ, De Klerk N, Blyth CC, Fathima P, Moore HC. Systematic review and meta-analysis of respiratory viral coinfections in children. *Respirology.* 2016;21(4):648–55.
60. Souza AP, Leitão LA, Luisi F, Souza RG, Coutinho SE, Silva JR, et al. Lack of association between viral load and severity of acute bronchiolitis in infants. *J Bras Pneumol.* [Internet] 2016 [cited 2020 Oct. 15];42(4):261–5. Available from: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-

37132016000400261&lng=en&tlng=en

61. Drews AL, Atmar RL, Glezen WP, Baxter BD, Piedra PA, Greenberg SB. Dual respiratory virus infections. *Clin Infect Dis*. 1997;25(6):1421–9.
62. De Paulis M, Gilio AE, Ferraro AA, Ferronato AE, do Sacramento PR, Botosso VF, et al. Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr (Rio J)*. [Internet] 2011 [cited 2020 Oct. 15];87(4):307–13. Available from: http://jped.com.br/conteudo/lng_resumo.asp?varArtigo=2204&cod=&idSecao=1
63. Goka EA, Vallely PJ, Mutton KJ, Klapper PE. Single and multiple respiratory virus infections and severity of respiratory disease: a systematic review. *Paediatr Respir Rev* [Internet]. 2013 [cited 2020 Oct. 15];15(4):363–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2013.11.001>
64. Asner SA, Science ME, Tran D, Smieja M, Merglen A, Mertz D. Clinical disease severity of respiratory viral co-infection versus single viral infection: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(6):e99392.
65. Richard N, Komurian-Pradel F, Javouhey E, Perret M, Rajoharison A, Bagnaud A, et al. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(3):213–7.
66. Fuller JA, Njenga MK, Bigogo G, Aura B, Ope MO, Nderitu L, et al. Association of the CT values of real-time PCR of viral upper respiratory tract infection with clinical severity, Kenya. *J Med Virol*. 2013;85(5):924–32.
67. Reina J, Morales C, Busquets M, Norte C. Usefulness of Ct value in acute respiratory infections caused by respiratory syncytial virus A and B and influenza virus A (H1N1)pdm09, A (H3N2) and B. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. [Internet]. 2018 [cited 2020 Oct. 15];36(6):332–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimce.2018.04.004>
68. Houben ML, Coenjaerts FE, Rossen JW, Belderbos ME, Hofland RW,

- Kimpen JL, et al. Disease severity and viral load are correlated in infants with primary respiratory syncytial virus infection in the community. *J Med Virol.* 2010;82(7):1266–71.
69. Bosis S, Esposito S, Niesters HG, Zuccotti GV, Marseglia G, Lanari M, et al. Role of respiratory pathogens in infants hospitalized for a first episode of wheezing and their impact on recurrences. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(7):677–84.
70. Piedra FA, Mei M, Avadhanula V, Mehta R, Aideyan L, Garofalo RP, et al. The interdependencies of viral load, the innate immune response, and clinical outcome in children presenting to the emergency department with respiratory syncytial virus-Associated bronchiolitis. *PLoS One.* 2017;12(3):1–16.
71. World Health Organization. Influenza: WHO Global RSV surveillance - objectives [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2020 [cited 2020 Oct. 15]. Available from: https://www.who.int/influenza/rsv/rsv_objectives/en/
72. Fry AM, Chittaganpitch M, Baggett HC, Peret TC, Dare RK, Sawatwong P, et al. The burden of hospitalized lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand. *PLoS One.* 2010;5(11): e15098.
73. Lu X, Holloway B, Dare RK, Kuypers J, Yagi S, Williams JV, et al. Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):533–9.
74. El Saleeby CM, Bush AJ, Harrison LM, Aitken JA, DeVincenzo JP. Respiratory syncytial virus load, viral dynamics, and disease severity in previously healthy naturally infected children. *J Infect Dis.* 2011;204(7):996–1002.
75. Fodha I, Vabret A, Ghedira L, Seboui H, Chouchane S, Dewar J, et al. Respiratory syncytial virus infections in hospitalized infants: association between viral load, virus subgroup, and disease severity. *J Med Virol.* 2007;79(12):1951–8.

76. DeVincenzo JP, El Saleeby CM, Bush AJ. Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants. *J Infect Dis.* 2005;191(11):1861–8.
77. Scagnolari C, Midulla F, Selvaggi C, Monteleone K, Bonci E, Papoff P, et al. Evaluation of viral load in infants hospitalized with bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *Med Microbiol Immunol.* 2012;201(3):311–7.
78. Zhou L, Xiao Q, Zhao Y, Huang A, Ren L, Liu E. The impact of viral dynamics on the clinical severity of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Med Virol.* 2015;87:1276–84.
79. DeVincenzo JP. Natural infection of infants with respiratory syncytial virus subgroups A and B: a study of frequency, disease severity, and viral load. *Pediatr Res.* 2004;56(6):914–7.
80. Garcia-Mauriño C, Moore-Clingenpeel M, Thomas J, Mertz S, Cohen DM, Ramilo O, et al. Viral load dynamics and clinical disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection. *J Infect Dis.* 2019;219(8):1207–15.
81. Van Leeuwen JC, Goossens LK, Hendrix RMGR, Van Der Palen J, Lusthusz A, Thio BJ. Equal virulence of rhinovirus and respiratory syncytial virus in infants hospitalized for lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(1):84–6.
82. Thwaites RS, Coates M, Ito K, Ghazaly M, Feather C, Abdulla, et al. Reduced nasal viral load and IFN responses in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis and respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198(8):1074–84.
83. Bennett BL, Garofalo RP, Cron SG, Hosakote YM, Atmar RL, Macias CG, et al. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2007;195(10):1532–40.
84. Russell CD, Unger SA, Walton M, Schwarze J. The human immune response to respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(2):481–502.
85. DeVincenzo JP, Wilkinson T, Vaishnav A, Cehelsky J, Meyers R, Nochur S, et al. Viral load drives disease in humans experimentally infected with

- respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(10):1305–14.
86. Jartti T, Hasegawa K, Mansbach JM, Piedra PA, Camargo Jr CA. Rhinovirus-induced bronchiolitis: lack of association between virus genomic load and short-term outcomes. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(2):509–12.
87. Ng KT, Oong XY, Lim SH, Chook JB, Takebe Y, Chan YF, et al. Viral load and sequence analysis reveal the symptom severity, diversity, and transmission clusters of rhinovirus infections. *Clin Infect Dis.* 2018;67(2):261–8.
88. Takeyama A, Hashimoto K, Sato M, Sato T, Kanno S, Takano K, et al. Rhinovirus load and disease severity in children with lower respiratory tract infections. *J Med Virol.* 2012;84(7):1135–42.
89. Lauinger IL, Bible JM, Halligan EP, Bangalore H, Tosas O, Aarons EJ, et al. Patient characteristics and severity of human rhinovirus infections in children. *J Clin Virol.* 2013;58(1):216–20.
90. Gerna G, Piralla A, Rovida F, Rognoni V, Marchi A, Locatelli F, et al. Correlation of rhinovirus load in the respiratory tract and clinical symptoms in hospitalized immunocompetent and immunocompromised patients. *J Med Virol.* 2009;81(8):1498–507.
91. Piralla A, Lilleri D, Sarasini A, Marchi A, Zecca M, Stronati M, et al. Human rhinovirus and human respiratory enterovirus (EV68 and EV104) infections in hospitalized patients in Italy, 2008-2009. *Diagn Microbiol Infect Dis.* [Internet] 2012 [cited 2020 Oct. 15];73(2):162–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.019>
92. Howard LM, Johnson M, Gil AI, Griffin MR, Edwards KM, Lanata CF, et al. Molecular epidemiology of rhinovirus detections in young children. *Open Forum Infect Dis.* 2016;3(1):1–8.
93. Scotta MC, Chakr VC, de Moura A, Becker RG, de Souza AP, Jones MH, et al. Respiratory viral coinfection and disease severity in children: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol.* 2016;80:45–56.

94. Mansbach JM, Piedra PA, Teach SJ, Sullivan AF, Forgey T, Clark S, et al. Prospective multicenter study of viral etiology and hospital length of stay in children with severe bronchiolitis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2012;166(8):700–6.
95. Chorazy ML, Lebeck MG, McCarthy TA, Richter SS, Torner JC, Gray GC. Polymicrobial acute respiratory infections in a hospital-based pediatric population. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(5):460–6.
96. Silva ER, Pitrez MC, Arruda E, Mattiello R, Sarria EE, de Paula FE, et al. Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent population: viral etiology and co-detection as risk factors. *BMC Infect Dis.* 2013;13:1–8.
97. Achten NB, Wu P, Bont L, Blanken MO, Gebretsadik T, Chappell JD, et al. Interference between respiratory syncytial virus and human rhinovirus infection in infancy. *J Infect Dis.* 2017;215(7):1102–6.
98. Pinky L, Dobrovoly HM. Coinfections of the respiratory tract: Viral competition for resources. *PLoS One.* 2016;11(5):1–19.
99. Meskill SD, O'Bryant SC. Respiratory virus co-infection in acute respiratory infections in children. *Curr Infect Dis Rep.* 2020;22(1):3.
100. Gulraiz F, Bellinghausen C, Dentener MA, Reynaert NL, Gaajetaan GR, Beuken EV, et al. Efficacy of IFN- λ 1 to protect human airway epithelial cells against human rhinovirus 1B infection. *PLoS One.* 2014;9(4):e95134.
101. Gonzalez AJ, Ijezie EC, Balemba OB, Miura TA. Attenuation of influenza A virus disease severity by viral coinfection in a mouse model. *J Virol.* 2018;92(23):1–21.
102. Laham FR, Israele V, Casellas JM, Garcia AM, Lac Prugent CM, Hoffman SJ, et al. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *J Infect Dis.* 2004;189(11):2047–56.
103. Stewart CJ, Hasegawa K, Wong MC, Ajami NJ, Petrosino JF, Piedra PA, et al. Respiratory syncytial virus and rhinovirus bronchiolitis are associated with distinct metabolic pathways. *J Infect Dis.* 2018;217(7):1160–9.

104. Arruda E, Jones MH, Escremim de Paula F, Chong D, Bugarin G, Notario G, et al. The burden of single virus and viral coinfections on severe lower respiratory tract infections among preterm infants a prospective birth cohort study in Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(10):997–1003.
105. Hasegawa K, Mansbach JM, Ajami NJ, Espinola JA, Henke DM, Petrosino JF, et al. Association of nasopharyngeal microbiota profiles with bronchiolitis severity in infants hospitalised for bronchiolitis. *Eur Respir J*. [Internet] 2016 [cited 2020 Oct. 2020];48(5):1329–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.00152-2016>
106. Feikin DR, Fu W, Park DE, Shi Q, Higdon MM, Baggett HC, et al. Is higher viral load in the upper respiratory tract associated with severe pneumonia? Findings from the PERCH study. *Clin Infect Dis*. 2017;64(Suppl 3):S337–46.
107. Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2000;55(8):688–97.
108. Espinosa Y, San Martín C, Torres AA, Farfán MJ, Torres JP, Avadhanula V, et al. Genomic loads and genotypes of respiratory syncytial virus: viral factors during lower respiratory tract infection in Chilean hospitalized infants. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):1–14.
109. Kadji FMN, Okamoto M, Furuse Y, et al. Differences in viral load among human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children with severe acute respiratory infections in the Philippines. *Virology* [Internet]. 2016 [cited 2020 Oct 15];13(1):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0565-8>
110. Vieira SE, Thomazelli LM, de Paulis M, Ferronato AE, Oliveira DB, Martinez MB, et al. Infections caused by hRSV A ON1 are predominant among hospitalized infants with bronchiolitis in São Paulo city. *Biomed Res Int*. 2017;2017:3459785.
111. Nicholson EG, Schlegel C, Garofalo RP, Mehta R, Scheffler M, Mei M, et al. Robust cytokine and chemokine response in nasopharyngeal secretions: association with decreased severity in children with physician

- diagnosed bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2016;214(4):649–55.
112. Vandini S, Bottau P, Faldella G, Lanari M. Immunological, viral, environmental, and individual factors modulating lung immune response to respiratory syncytial virus. *Biomed Res Int.* 2015;2015:875723.
113. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações CGPNI/SVS/MS. Influenza: monitoramento até a Semana Epidemiológica 49 de 2019. *Boletim Epidemiológico.* 2019;50(38):1-43.
114. Brasil. Ministério da Saúde. Semana Epidemiológica 40 (27/09/2020 a 03/10/2020): situação epidemiológica da Covid-19. Brasília (DF): Secretaria de Vigilância em Saúde; 2020. (*Boletim Epidemiológico Especial; 34*).