



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE BIOMEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**FRANCISCO ELICLÉCIO RODRIGUES DA SILVA**

**DETECÇÕES DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS E *Streptococcus pneumoniae* EM**  
**CRIANÇAS COM PNEUMONIA APÓS A INCLUSÃO DA VACINA**  
**PNEUMOCÓCICA 10-VALENTE CONJUGADA NO CARTÃO VACINAL**  
**INFANTIL**

**FORTALEZA**

**2014**

**FRANCISCO ELICLÉCIO RODRIGUES DA SILVA**

**DETECÇÕES DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS E *Streptococcus pneumoniae* EM  
CRIANÇAS COM PNEUMONIA APÓS A INCLUSÃO DA VACINA  
PNEUMOCÓCICA 10-VALENTE CONJUGADA NO CARTÃO VACINAL  
INFANTIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Microbiologia. Área de concentração: Virologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Edna Araujo Moura

**FORTALEZA**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S58d Silva, Francisco Eliclécio Rodrigues.  
DETECÇÕES DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS E *Streptococcus pneumoniae* EM CRIANÇAS COM PNEUMONIA APÓS A INCLUSÃO DA VACINA PNEUMOCÓCICA 10-VALENTE CONJUGADA NO CARTÃO VACINAL INFANTIL / Francisco Eliclécio Rodrigues Silva. – 2014.  
77 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2014.  
Orientação: Profa. Dra. FERNANDA EDNA ARAUJO MOURA.
1. vírus respiratórios. 2. *Streptococcus pneumoniae*. 3. vacina. I. Título.

CDD 616.9

---

**FRANCISCO ELICLÉCIO RODRIGUES DA SILVA**

**DETECÇÕES DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS E *Streptococcus pneumoniae* EM  
CRIANÇAS COM PNEUMONIA APÓS A INCLUSÃO DA VACINA  
PNEUMOCÓCICA 10-VALENTE CONJUGADA NO CARTÃO VACINAL  
INFANTIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia. Área de concentração: Virologia.

Aprovada em: 22/12/2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Edna Araujo Moura (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima da Silva Teixeira  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

*“A Deus, por iluminar meu caminho;  
À minha família, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.”*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Edna Araújo Moura, minha orientadora, pela oportunidade e por toda a colaboração e atenção dispensadas ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pelo seu empenho para o funcionamento deste programa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cibele Mano Barreto, responsável pelo Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal do Ceará, por colaborar na realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. André Jalles Monteiro, pelo auxílio imprescindível na análise estatística dos dados.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, pela sua dedicação para o funcionamento deste programa, e por ter aceitado gentilmente a participar da avaliação desse trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima da Silva Teixeira, membro da banca, por ter aceitado gentilmente a participar da avaliação desse trabalho.

A todos os professores do programa, pelo aprendizado compartilhado.

Ao Brunno Jaegger e Nayara Oliveira, pela amizade e grande ajuda na realização de parte dos experimentos deste trabalho.

À Carol Soares, secretária do programa, por sua ajuda e paciência em muitos momentos dessa jornada.

Ao Olavo Morais, técnico do setor de microbiologia, pelo auxílio concedido para a realização desse trabalho.

A todos os que fazem, ou fizeram parte, do Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Ceará, Samuel Arruda, Mário Oliveira, Caroline Gurgel e Alice Alves, por passarem novos conhecimentos.

Aos amigos conquistados durante essa caminhada, Sabrynna Oliveira, Morgana Barboza, Leandro Lima, Hassã Lemos e Christer Ocadaque, pelo apoio e estímulo em todos os momentos.

A todos meus colegas de curso, em especial Glaucia Guedes e Cecília Costa, que me acompanharam desde a seleção e tornaram-se grandes companheiras nessa jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

“Longo é o caminho ensinado pela teoria,  
curto e eficaz o do exemplo.”

Sêneca

## RESUMO

A pneumonia é responsável por aproximadamente 1,6 milhões de óbitos anuais em crianças com idade inferior a cinco anos no mundo. Um grupo de vírus e bactérias está associado à etiologia dessa infecção sendo comumente relatadas associações entre eles. Como estratégia de redução da mortalidade infantil por essa afecção foi incorporada, em 2010 no Brasil, a vacina pneumocócica conjugada 10 valente no calendário vacinal infantil. Este estudo teve como objetivo determinar a taxa de detecção de diversos vírus respiratórios e *Streptococcus pneumoniae*, inclusive seus sorotipos, em crianças com pneumonia após a introdução da vacina pneumocócica 10 valente conjugada no calendário vacinal infantil. Para isso foram analisadas amostras de aspirados de nasofaringe na detecção rápida de antígenos através de imunofluorescência indireta para o Vírus Sincicial Respiratório, Adenovírus, Influenza A e B e Parainfluenza 1, 2 e 3. Após o isolamento de *S. pneumoniae* foi utilizado PCR multiplex para sua sorotipagem. Foram analisadas 781 amostras. A detecção dos vírus respiratórios e *S. pneumoniae* variou durante os anos de 2011, 2012 e 2013, tendo no final 441 (56,47%) amostras negativas para ambos os microorganismos, 199 (25,48%) positivas para pelo menos um vírus, sendo o VSR o mais detectado, 184 (23,56%) positivas para *S. pneumoniae* e (5,51%) tiveram detecção mista (sendo a detecção concomitante do pneumococo com o VSR, 60,47%, a mais frequente). Houve uma redução no percentual de detecção do pneumococo ao longo dos anos estudados, com predominância dos sorotipos vacinais (69/54,33%). No entanto, apesar da queda no número de *S.pneumoniae* detectados, estejam eles presentes ou não na vacina, parece haver um número crescente de cepas circulantes do pneumococo não incluída na vacina, fato este mais evidente no ano de 2013. Sendo o perfil dos sorotipos de *S. pneumoniae* diferente de uma região para outra e a imunidade sorotipo-específica é necessária uma vigilância contínua para o conhecimento dos sorotipos circulantes para assegurar que futuras vacinas sejam voltadas para os sorotipos adequados.

**Palavras-chave:** vírus respiratórios, *Streptococcus pneumoniae*, vacina.

## ABSTRACT

Pneumonia is responsible for approximately 1.6 million annual deaths in children of age five and below worldwide. A group of virus and bacteria is associated with the etiology of this infection being commonly reported the association between them. As strategy of reducing child mortality from this condition, in 2010 it was incorporated the 10-valent pneumococcal vaccine to the child immunization calendar. The objective of this study is to determine the rate of detection of several respiratory viruses and *Streptococcus pneumoniae*, including its serotypes, in children with pneumonia after the introduction of the 10-valent pneumococcal vaccine in the child immunization calendar. For this, samples of nasopharyngeal aspirates were analyzed in rapid antigen detection by indirect immunofluorescence for Respiratory Syncytial Virus, adenovirus, Influenza A and B and Parainfluenza 1, 2 and 3. After the isolation of *S. pneumoniae*, it was used the multiplex PCR for its serotyping. 781 samples were analyzed. The detection of the respiratory viruses and *S. pneumoniae* ranged during the years 2011, 2012 and 2013, in which, at the end, 441 (56,47%) of the samples were negative for both microorganisms, 199 (25,48%) were positive for at least one virus, being the RSV the most detected, 184 (23,56%) were positive for *S. pneumoniae* and 43 (5,51%) were positive for coinfection (the simultaneous detection of the pneumococcus and the RSV, 60,47%, was the most frequent). There was a percentage reduction of the detection of pneumococcus over the years studied, with the predominance of vaccinal serotypes (69/54,33%). However, despite the decrease of detection of *S. pneumoniae*, whether they are present or not in the vaccine, there seems to be a growing number of circulating strains of pneumococcus not included in the vaccine, this fact is more evident in the year 2013. As the profile of prevalent serotypes of *S. pneumoniae* differs from one region to another and the immunity is serotype-specific, it is necessary a continuous surveillance for the knowledge of the circulation of serotypes that are not included in the vaccine and to ensure that the future vaccines target the appropriate serotypes.

**Keywords:** respiratory viruses, *Streptococcus pneumoniae*, vaccine.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características da população de estudo.....	39
Tabela 2 –	Características da população de estudo quanto à presença de comorbidades e fatores de risco para IRA.....	40
Tabela 3 –	Sinais e sintomas apresentados pela população de estudo.....	41
Tabela 4 –	Detecção do total de vírus respiratórios e <i>S. pneumoniae</i> na população de estudo.....	42
Tabela 5 –	Detecção de vírus respiratórios durante o período de estudo.....	43
Tabela 6 –	Detecção mista (vírus e <i>S. pneumoniae</i> ) no estudo.....	43
Tabela 7 –	Co-deteção de vírus no estudo.....	43
Tabela 8 –	Detecção de microrganismos pesquisados em relação à vacinação contra influenza e pneumococo.....	44
Tabela 9 –	Distribuição da população de estudo por sexo, idade, comorbidades e destino final em relação aos microrganismos detectados.....	48
Tabela 10 –	Sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> circulantes.....	49
Tabela 11 –	Número de sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> circulantes nos anos estudados agrupados quanto à inclusão na VPC-10.....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização genética da região do DNA do <i>S. pneumoniae</i> entre os genes dexB e aliA.....	26
Figura 2 – Distribuição dos casos de pneumonia, pluviometria e detecção dos vírus respiratórios e <i>S. pneumoniae</i> na população de estudo.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcM	Anticorpo monoclonal
ANF	Aspirado de Nasofaringe
CRIE	Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais
DPI	Doença Pneumocócica Invasiva
DT	Toxóide diftérico
HÁ	Hemaglutinina
HBoV	Bocavírus humano
HIAS	Hospital Infantil Albert Sabin
HPIV	Vírus parainfluenza humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFI	Imunofluorescência indireta
Ipea	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
MEM-E	Meio Essencial Mínimo com sais de Earle
NA	Neuraminidase
ODM	Objetivos de Desenvolvimento do Milênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNI	Programa Nacional de Imunização
RPM	Rotações por Minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
TT ou T	Toxóide tetânico
VPC-7	Vacina Pneumocócica 7 Valente (conjugada)
VPC-10	Vacina Pneumocócica 10 Valente (conjugada)
VSR	Vírus Sincicial Respiratório

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1 Aspectos gerais .....	14
2.2 Agentes etiológicos das pneumonias .....	16
2.2.1 <i>Vírus Sincicial Respiratório (VSR)</i> .....	17
2.2.2 <i>Vírus Influenza</i> .....	18
2.2.3 <i>Vírus Parainfluenza</i> .....	20
2.2.4 <i>Adenovírus</i> .....	21
2.2.5 Outros vírus respiratórios .....	22
2.2.6 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	23
2.2.6.1 <i>Histórico</i> .....	23
2.2.6.2 <i>Aspectos gerais</i> .....	24
2.2.6.3 <i>Epidemiologia</i> .....	27
2.3 <i>Coinfecção entre vírus respiratórios e S. pneumoniae</i> .....	27
2.4 <i>Vacina</i> .....	29
3 HIPÓTESES.....	30
4 OBJETIVO GERAL.....	31
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5.1 <i>Descrição do estudo</i> .....	32
5.1.1 <i>Tipo de estudo</i> .....	32
5.1.2 <i>População e local de estudo</i> .....	32
5.1.3 <i>Critérios de inclusão</i> .....	32
5.1.4 <i>Critérios de exclusão</i> .....	32
5.1.5 <i>Aspectos éticos</i> .....	32
5.1.6 <i>Material clínico e coleta de dados</i> .....	33
5.1.7 <i>Coleta das amostras</i> .....	33
5.2 <i>Diagnóstico Laboratorial</i> .....	33
5.2.1 <i>Processamento das amostras</i> .....	33
5.2.2 <i>Reação de imunofluorescência indireta</i> .....	33
5.2.3 <i>Isolamento bacteriano e identificação de S. pneumoniae</i> .....	34
5.2.4 <i>Estocagem das amostras</i> .....	35
5.2.5 <i>Extração do DNA de S. pneumoniae</i> .....	35

5.2.6 <i>Primers</i> .....	36
5.2.7 <i>PCR Multiplex</i> .....	36
5.2.8 <i>Análise estatística</i> .....	37
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
6.1 <b>Características gerais da população de estudo</b> .....	<b>38</b>
6.2 <b>Deteção dos microrganismos pesquisados</b> .....	<b>42</b>
6.3 <b>Estado vacinal da população de estudo</b> .....	<b>44</b>
6.4 <b>Sazonalidade das pneumonias e de microrganismos detectados</b> .....	<b>44</b>
6.5 <b>Características da população positiva para os microrganismos pesquisados</b> .....	<b>47</b>
6.6 <b>Sorotipos de <i>S.pneumoniae</i> circulantes</b> .....	<b>49</b>
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
7.1 <b>Limitações do estudo</b> .....	<b>54</b>
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>57</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>71</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pneumonia figura como a principal causa de morte prevenível por vacinação em crianças, acometendo principalmente aquelas com idade inferior a cinco anos. É responsável por cerca de 20% dos 8,8 milhões de óbitos anuais em todo o mundo. No Brasil, também é uma importante causa de hospitalização no Sistema Único de Saúde (SUS): só em 2009 o número de hospitalizações por pneumonias cresceu cerca de 20% (BRASIL, 2007; ANDRADE, et al. 2011).

Vários agentes etiológicos são identificados como causa de pneumonias. Comumente os vírus Influenza A e B; Parainfluenza 1, 2 e 3; Vírus Sincicial Respiratório (VSR) e Adenovírus são conhecidos como causadores de infecções respiratórias agudas baixas. Dentre os agentes bacterianos principais encontram-se *S. pneumoniae* que contribui com aproximadamente 60-75% das pneumonias bacterianas na infância (NOLTE, 2008; ANDRADE, et al. 2011; VERANI, et al. 2013).

O trato respiratório superior humano é reservatório de uma comunidade diversificada de potenciais patógenos comensais incluindo o *S. pneumoniae* que ocasionalmente se tornam causadores de doenças infecciosas. Sua colonização poderá ser facilitada pela infecção causada por algum vírus respiratório que lesa a mucosa e prejudica seus mecanismos locais de defesa, favorecendo o surgimento de infecções secundárias, especialmente em crianças com um sistema imunológico imaturo. As associações entre bactérias e vírus nas infecções do trato respiratório podem estar presentes em até dois terços dos casos. No Brasil foi incorporada, no ano de 2010, ao calendário de vacinação infantil a vacina pneumocócica conjugada contendo 10 sorotipos específicos de polissacarídeos (VPC-10) (BLASER & FALKOW, 2009; ANDRADE, et al. 2011).

Neste cenário é importante determinar os vírus respiratórios, bem como os sorotipos de pneumococo circulantes na comunidade, mantendo uma vigilância que possa contribuir para a escolha de estratégias no combate dessa infecção.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos Gerais

Pode-se observar, através de estudos sistemáticos, que a estimativa mundial de pneumonias entre crianças menores de cinco anos difere entre os países, principalmente entre aqueles desenvolvidos e em desenvolvimento. Em 2000 estimou-se cerca de 0,29 episódios por criança/ano em países em desenvolvimento, com incidência anual de 150,7 milhões de casos novos, dos quais 13,1 milhões (8,7%) eram graves o suficiente para exigir hospitalização. Em países desenvolvidos a incidência era de 0,05 episódios/ano (RUDAN, et al. 2008). Já em 2010, novos estudos foram realizados mostrando uma diminuição destes números: Nos países em desenvolvimento a incidência foi de 0,29 para 0,22 episódios/ano, uma redução notável de cerca de 25% ao longo do período de uma década, e nos países desenvolvidos foi de 0,05 para 0,015 episódios/ano (RUDAN, et al. 2013).

A incidência de pneumonia é mais alta no Sudeste da Ásia (0,36 episódios por criança/ano), seguido pela África (0,33 episódios por criança/ano) e Mediterrâneo Oriental (0,28 episódios por criança/ano), e mais baixa no Pacífico Ocidental (0,22 episódios por criança/ano), Américas (0,10 episódios por criança/ano) e Regiões da Europa (0,06 episódios por criança/ano) (RUDAN, et al. 2008; WALKER, et al. 2013).

Em 2010 foram observados, no mundo, cerca de 120 milhões de episódios de pneumonia em crianças menores de cinco anos (14 milhões evoluíram com gravidade), e no ano seguinte 1,3 milhão de pneumonias levaram à morte. Do total, 81% dos casos aconteceram nos primeiros dois anos de vida, sugerindo ser crucial uma maior ênfase na prevenção e no tratamento das crianças, principalmente nesta faixa etária (WALKER, et al. 2013).

Há alguns países que se destacam por concentrarem juntos aproximadamente 74% dos episódios de pneumonias do mundo, são eles: Índia, China, Paquistão, Bangladesh, Nigéria, Indonésia, Etiópia, República Democrática do Congo, Vietnã, Filipinas, Sudão, Afeganistão, República Unida da Tanzânia, Mianmar e Brasil. Dentre estes, mais da metade dos novos casos de pneumonia do mundo estão concentrados em apenas seis, onde 44% das crianças do mundo com idade inferior a cinco anos vivem: Índia (43 milhões), China (21 milhões),

Paquistão (10 milhões) e Bangladesh, Indonésia e Nigéria (6 milhões cada) (RUDAN, et al. 2008).

Já em relação às hospitalizações, dados do Ministério da Saúde apontam a relevância da pneumonia destacando-a como a segunda maior causa de hospitalizações. Nesses casos também foram observadas uma redução nos números entre 1998 e 2005. Oitenta por cento das crianças internadas tinham menos de cinco anos. Como dito anteriormente, essa é a faixa etária de maior vulnerabilidade para essa afecção (BRASIL, 2007; ANDRADE, et al. 2011).

Nas últimas décadas, o Brasil passou por mudanças nos principais determinantes sociais da saúde e na organização dos serviços de saúde. As taxas de mortalidade infantil foram reduzidas substancialmente, diminuindo 5,5% ao ano nas décadas de 1980 e 1990, e 4,4% ao ano desde 2000, chegando a 20 mortes por 1.000 nascidos vivos em 2008 (VICTORA, et al. 2011).

As razões por trás do progresso do Brasil incluem a adoção de programas verticais de saúde (promoção do aleitamento materno, hidratação oral e imunizações) (VICTORA, et al. 2011). No que diz respeito à pneumonia, uma importante ação foi a utilização da vacina contra o *Streptococcus pneumoniae*, que contribui com aproximadamente 60-75% das pneumonias bacterianas na infância. No ano de 2009, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprovou o uso da vacina pneumocócica conjugada contendo 10 sorotipos específicos de polissacarídeos (VPC-10). No primeiro semestre de 2010, a VPC-10 foi incorporada ao calendário de vacinação do Programa Nacional de Imunização (PNI). A introdução da vacina ocorreu de forma gradativa nas diferentes Unidades da Federação do país, com as três doses administradas aos 2, 4 e 6 meses no primeiro ano de vida e uma dose de reforço entre 12 e 15 meses de idade (ANDRADE, et al. 2011). No primeiro ano, aproximadamente seis milhões de crianças em todo país foram contempladas com imunização ativa contra doença invasiva e otite média aguda causadas pelos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F de *S. pneumoniae* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010B).

São notáveis os avanços do Brasil na redução da mortalidade infantil. A taxa passou de 53,7 em 1990 para 17,7 óbitos por mil nascidos vivos em 2011, atingindo, com antecedência, a meta dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM), que era de reduzir até 2015 a mortalidade na infância a dois terços do nível de 1990 (IPEA, 2014). No entanto, podem-se observar desigualdades entre regiões. Estudos realizados pelo Ipea - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - e dados do IBGE demonstraram que as desigualdades regionais no

território brasileiro poderiam ser superadas focando os investimentos na resolução de alguns problemas. A partir destes estudos firmou-se o Protocolo de Cooperação Federativa que tem por objeto estabelecer metas para acelerar a redução das desigualdades nas regiões Nordeste e Amazônia Legal, mediante ações cooperadas e solidárias entre a União e os Estados federados, com a participação dos municípios, pactuando para isso algumas metas como a de reduzir em 5% ao ano a taxa de mortalidade infantil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010A).

Com intervenções públicas focadas em grupos mais vulneráveis e no desenvolvimento socioeconômico da região induzido por políticas públicas inclusivas, as diferenças entre as taxas de mortalidade infantil das regiões Nordeste e Sul foram diminuindo gradativamente. Em 1990, a mortalidade na região Nordeste era 2,5 vezes maior que a do Sul, diferença que foi reduzida para 1,6 vezes em 2011. O índice, que era superior a 70 óbitos de menores de 1 ano por mil nascidos vivos em 1990, reduziu-se em média 6,6% ao ano, chegando a menos de 20 óbitos por mil nascidos vivos em 2011, valor encontrado também na região Norte (FRIAS, et al. 2013; IPEA, 2014).

## **2.2 Agentes etiológicos das pneumonias**

Os vírus predominam nos primeiros anos de vida e as etiologias das pneumonias virais dependem de alguns fatores como, por exemplo, a época do ano, já que algumas dessas viroses são sazonais, com predomínio no inverno, ou mesmo epidêmicas. Também dependem do uso de métodos diagnósticos sensíveis e confiáveis para a detecção viral, como os métodos moleculares de detecção genômica. Tradicionalmente são conhecidos como causadores de infecções respiratórias agudas baixas o Vírus Sincicial Respiratório (VSR), os vírus Influenza A e B; Parainfluenza 1, 2 e 3 e Adenovírus (CASHAT-CRUZ, et al. 2005; NOLTE 2008; RUUSKANEN, et al. 2013; VERANI, et al. 2013).

Atualmente há diversos métodos de diagnóstico disponíveis para infecções virais (cultura de células, métodos sorológicos, imunoenzimáticos e imunofluorescência), em espécimes clínicos como sangue e *swabs* ou aspirados de secreções de nasofaringe. No entanto, nos últimos anos tem-se popularizado técnicas mais sensíveis para detecção genômica desses patógenos como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas diversas variantes, que aumentam a sensibilidade na detecção destes e outros patógenos, elevando a significância do diagnóstico viral inclusive quanto à descoberta de novos vírus de importância

clínica, por exemplo, os Metapneumovírus, Rinovírus, Bocavírus e coronavírus. Contudo, nos países em desenvolvimento, o diagnóstico de pneumonia ainda é estabelecido com base nos parâmetros clínicos e achados radiológicos (CASHAT-CRUZ, et al. 2005; RUUSKANEN, et al. 2013).

Um grande número de agentes etiológicos é identificado como causa de pneumonias. Os agentes encontrados são diferentes para cada faixa etária e o conhecimento dos agentes esperados irá orientar o tratamento específico. Dentre os agentes bacterianos principais encontram-se *S. pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, com progressivo destaque para o primeiro (BRASIL, 2007; BERKLEY, et al. 2010; LEVINE, et al. 2012).

### 2.2.1 Vírus Sincicial Respiratório (VSR)

Os VSR pertencem à ordem *Mononegvirales*, família *Paramyxoviridae*, sub família *Pneumovirinae*, gênero *Pneumovirus* (ICTV, 2014). Tratam-se de vírus envelopados com RNA de fita simples não segmentado que codifica 11 proteínas. Duas glicoproteínas de superfície são os principais antígenos de neutralização: a proteína de ligação glicosilada (G), que tem uma diversidade de sequência de moderada a alta e subdivide-se em dois grupos antigênicos (A e B); e a proteína de fusão (F), que é altamente conservada entre as cepas de ambos os grupos (SHAW, et al. 2013).

São chamados de vírus sincicial respiratório (VSR) devido a sua afinidade pelas células do trato respiratório e sua capacidade de formar sincícios em cultura de células. Mundialmente o VSR é o principal agente viral causador de pneumonias e bronquiolites em crianças, a maioria têm infecção por VSR durante seu primeiro ano de vida, e poderia ser a causa viral predominante de pneumonia grave nesta população (BERKLEY, et al. 2010; NAIR, et al. 2010).

Aproximadamente 2,1 milhões de crianças americanas com menos de 5 anos de idade são tratadas para doenças causadas por VSR a cada ano. Mundialmente, entre crianças nesta mesma faixa etária o VSR provoca uma estimativa de 33,8 milhões/ano de infecções do trato respiratório inferior, resultando em 66.000 a 199.000 mortes, 99% das quais ocorrem em países em desenvolvimento (HALL, et al. 2009; NAIR, et al. 2010). Crianças menores de dois anos prematuras e que têm doença pulmonar crônica ou doença cardíaca congênita têm risco

aumentado para pneumonia e bronquiolite associadas ao VSR. Felizmente, a maioria dos casos de infecção pelo VSR apresentam sintomas relativamente leves como febre, coriza e tosse, e respondem bem à terapia de suporte. No entanto, alguns grupos de crianças têm maior risco de desenvolver formas graves da doença, levando à hospitalização com necessidade de cuidados intensivos e ventilação mecânica, ou à morte (NAIR, et al. 2010; SHAW, et al. 2013).

Uma infecção por VSR não produz imunidade contra uma infecção subsequente, sendo comum as reinfecções. Anualmente as epidemias por VSR ocorrem em períodos conhecidos, em regiões de clima temperado as epidemias ocorrem nos meses de inverno, enquanto que nas áreas tropicais estão associados com a estação das chuvas e em áreas semi-tropicais o vírus circula principalmente durante o outono. Ambos os grupos circulam simultaneamente nos períodos epidêmicos, sendo normalmente prevalente o grupo A (SHAW, et al. 2013).

O tratamento recomendado para infecções causadas pelo VSR consiste principalmente de suporte respiratório e hidratação (SHAW, et al. 2013). Nenhuma terapia anti-viral específica é recomendada. No entanto, há disponível o Palivizumab®, um anticorpo monoclonal que atua ligando-se a glicoproteína G, usado para a profilaxia de crianças com maior risco de infecção grave, mas é muito oneroso e pouco prático para uso universal (HAMPP, et al. 2011).

### 2.2.2 *Vírus Influenza*

Pertencentes à família *Orthomyxoviridae*, gênero *Influenzavírus*, espécie Influenza (A, B ou C) vírus (ICTV, 2014). São vírus envelopados com RNA fita simples sentido negativo dividida em oito segmentos. Possuem duas glicoproteínas no envelope viral de extrema importância, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), que são alvos da resposta imune do hospedeiro com a produção de anticorpos neutralizantes. A infecção viral começa pela ação da hemaglutinina que se liga na membrana celular a resíduos de ácido siálico. Após a adsorção e endocitose, ocorre o processo de multiplicação viral intracelular finalizando com a liberação das partículas virais. A neuraminidase atua nesta fase final onde cliva os resíduos de ácido siálico da membrana citoplasmática liberando as partículas virais e fazendo com que a infecção se propague para células vizinhas. Estudos sobre a patogênese da pneumonia por

influenza mostram que o vírus, em casos de diferentes gravidades, acomete pneumócitos como alvo primário causando dano alveolar difuso (TAUBENBERGER & MORENS, 2008).

As variações antigênicas de HA e NA contribuem para a natureza epidêmica dos vírus influenza por dois mecanismos: variações antigênicas menores conhecidas como *drift*, que alteram os epítomos alvo de anticorpos neutralizantes, e variações maiores denominadas de *shift*, que ocorrem por substituições de segmentos genômicos virais quando há infecção simultânea por dois tipos de vírus influenza. Sabe-se da existência de pelo menos 16 hemaglutininas antigenicamente específicas (H1-H16) e 9 neuraminidases (N1-N9), sendo os vírus influenza A possuidores das H1-H3 conhecidos como causadores da maioria dos casos humanos. As outras hemaglutininas são associadas a vírus de aves aquáticas ou de outros mamíferos. Um exemplo de mutação *shift* foi do vírus responsável pelas pandemias em 1918 (H1N1), 1957 (H2N2) e 1968 (H3N2) (GIRARD, et al. 2010).

As epidemias por vírus influenza A costumam ocorrer anualmente, durante o inverno, perdurando por 6 a 8 semanas no local e com casos de gravidade variável. A transmissão viral acontece através de pequenas partículas aerossolizadas pela tosse ou espirro de indivíduos infectados e pelo contato com fômites. A doença possui um período de incubação de 2-3 dias. Esse mecanismo de transmissão, associado a um curto período de incubação, propicia as grandes epidemias dessa doença (TELLIER, 2006; TAUBENBERGER & MORENS, 2008).

A estratégia preferida contra a gripe é a prevenção desta infecção com imunização anual, mas existem certas situações em que é benéfico o uso de agentes antivirais. Duas classes de medicamentos antivirais estão disponíveis para tratamento ou profilaxia de infecções de gripe: são os inibidores da neuraminidase (oseltamivir-Tamifu® e zanamivir) e os adamantanes (amantadina e rimantadine). São pouco reconhecidas por enzimas humanas e bem reconhecidas pela enzima viral, agindo tanto no vírus influenza A quanto no B, o que diminui as chances de efeitos colaterais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O Ministério da Saúde disponibiliza estes medicamentos no SUS (Sistema Único de Saúde) e dados clínicos e observacionais demonstram que o tratamento com oseltamivir de maneira precoce pode reduzir a duração dos sintomas principalmente em pacientes imunossuprimidos. A indicação de zanamivir somente está autorizada em casos de impossibilidade clínica da manutenção do uso do fosfato de oseltamivir. O zanamivir é contraindicado em menores de cinco anos para tratamento ou para quimioprofilaxia e para todo paciente com doença respiratória crônica pelo risco de bronco-espasmo severo. Também

não pode ser administrado para paciente em ventilação mecânica pela possibilidade de obstruir os circuitos do ventilador (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Como todos os medicamentos antivirais o tratamento mais cedo no curso da infecção oferece mais chances de ser obtido o benefício máximo. Tratamento quando começado tão cedo quanto 12 horas após o início dos sintomas tem o maior impacto sobre a resolução da doença (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES, 2007).

A vacinação contra o vírus influenza é anual, devido às mudanças das características desses vírus consequentes da diversidade antigênica e genômica e é realizada desde 1999 entre os meses de abril e maio. No ano de 2014, além de indivíduos com 60 anos ou mais de idade, são vacinados os trabalhadores de saúde, os povos indígenas, as crianças na faixa etária de 6 meses a menores de 5 anos de idade (4 anos, 11 meses e 29 dias), as gestantes, as puérperas (até 45 dias após o parto), os grupos portadores de doenças crônicas não transmissíveis e outras condições clínicas especiais, a população privada de liberdade e os funcionários do sistema prisional. Com um público alvo representando aproximadamente 49,6 milhões de pessoas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Segundo recomendação da OMS para a temporada de 2014 do hemisfério sul a vacina influenza é composta por cepas (fragmentada e inativada), trivalente, contendo antígenos equivalentes à:

- ✓ Vírus similar ao vírus influenza A /Califórnia/7/2009 (H1N1) pdm09
- ✓ Vírus similar ao vírus influenza A/Texas/50/2012 (H3N2)
- ✓ Vírus similar ao vírus influenza B/Massachusetts/2/2012 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

### **2.2.3 Vírus Parainfluenza**

São vírus de RNA, fita simples, polaridade negativa, envelopados, pertencentes à ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, no gênero *Respirovirus* (espécie vírus parainfluenza 1 humana e vírus parainfluenza 3 humana), e no gênero *Rubulavirus* (espécie vírus parainfluenza 2 humano e vírus parainfluenza 4 humano) (ICTV, 2014).

São importantes causas de doença do trato respiratório especialmente em crianças. Vírus parainfluenza 3 humano (HPIV-3) sozinho é responsável por aproximadamente 11% das

internações respiratórias pediátricas nos EUA, enquanto vírus parainfluenza 1 e 2 humano (HPIV-1 e HPIV-2, respectivamente) tendem a infectar crianças mais velhas e adolescentes, além de ser relatado como causa predominante de laringotraqueobronquite (crupe) em lactentes. Juntos ficam atrás apenas do VSR como causa de internações hospitalares (2% - 17%) por infecções respiratórias agudas nessa faixa etária (IWANE, et al. 2004; MOSCONA, 2005; LIU, et al. 2013).

Os HPIV se replicam no epitélio do trato respiratório superior e se propagam a partir daí para o trato respiratório inferior. A relação entre o dano tecidual causado pelo vírus, as respostas imunes que ajudam a eliminá-lo e as respostas inflamatórias que contribuem para a doença ainda é desconhecida. Ambos os componentes, humorais e celulares, do sistema imune parecem contribuir para a proteção e patogênese. A infecção primária por qualquer HPIV não confere imunidade permanente, podendo haver reinfecção com o mesmo agente depois de decorrido certo período da infecção anterior. Essa falta de compreensão dos processos fundamentais da biologia viral e da interação destes vírus com seus hospedeiros durante a patogênese é um obstáculo para o desenvolvimento de formas de prevenção e tratamento para infecções causadas por este agente (IWANE, et al. 2004; MOSCONA, 2005; LIU, et al. 2013).

A imunidade gerada após a primeira infecção é, no entanto, muitas vezes suficiente para restringir a replicação do vírus no trato respiratório inferior e prevenir doenças mais graves (IWANE, et al. 2004; MOSCONA, 2005). Atualmente não há medicamentos antivirais com eficácia clínica comprovada contra HPIV (HENRICKSON, 2003).

#### **2.2.4 Adenovírus**

Pertence a família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus*, espécie *Adenovirus humano* (ICTV, 2014). São vírus não envelopados com genoma composto por DNA de fita dupla linear e não segmentado, atualmente já foram relatados 55 sorotipos de adenovírus humanos, classificados em 7 espécies (subgrupos de A a G) (JONES II, et al. 2007; WALSH, et al. 2010).

Alguns subgrupos e sorotipos são mais comumente associados a síndromes específicas de doenças e a contextos epidemiológicos como é o caso dos sorotipos 1, 2, 3, 5, 6 e 7 conhecidos por causarem principalmente doenças respiratórias, enquanto que os sorotipos 40

e 41 são comumente associados a gastroenterite. Alguns estudos fazem associação entre os sorotipos e subgrupos específicos e apresentação mais grave da doença. Os adenovírus são responsáveis por cerca de 7 a 8% das infecções respiratórias virais relatadas na infância em todo o mundo. Embora as maiorias das infecções sejam auto-limitadas, os adenovírus têm sido associados com infecções graves e até mesmo fatais em indivíduos imunocomprometidos (MANDELBOIM, et al. 2011).

Infelizmente, não existe qualquer tratamento definitivo para a infecção por adenovirus no momento. O papel dos agentes antivirais não está provado e os componentes mais importante da terapia são os cuidados de suporte (MUNKSGAARD, 2004)

### **2.2.5 *Outros vírus respiratórios***

O desenvolvimento de técnicas moleculares conduziu a avanços significativos no diagnóstico viral, tanto aumentando a sensibilidade na detecção destes patógenos quanto a descoberta de novos vírus de importância clínica. O advento da técnica de PCR e suas variações foi uma delas, empregada cada vez mais no diagnóstico dos agentes causadores de infecções respiratórias, tem mostrado vírus que antes não eram associados a essas infecções, como é o caso dos rinovírus, metapneumovírus, coronavírus e bocavírus (NOLTE, 2008; BERKLEY, et al. 2010; RUUSKANEN, et al. 2013).

O metapneumovírus humano foi relatado pela primeira vez em 2001, em crianças com doença do trato respiratório na Holanda (HOOGEN, et al. 2001). É um patógeno respiratório comum particularmente em lactentes e crianças jovens. O vírus está associado a infecções das vias respiratórias superiores e inferiores e tem uma distribuição mundial. Estudos sorológicos relatam que até os cinco anos de idade quase todos os indivíduos apresentaram evidências de infecção por metapneumovírus (HOOGEN, et al. 2001; KAHN, 2006; CAMPS, et al. 2008).

Os rinovírus são normalmente associados com o resfriado comum em crianças de maior idade e adultos, embora também desempenhem um papel importante na exacerbação da asma e bronquite crônica sendo responsável por cerca de dois terços dos casos (KUSEL, et al. 2006; MACKAY, 2008). Estudos têm relatado com maior frequência a detecção de rinovírus em pneumonias, no entanto, ainda há muito o que esclarecer em relação ao seu papel nestas infecções em decorrência tanto da escassez de testes sorológicos quanto da alta frequência de

deteccão em indivíduos assintomáticos (JARTTI, et al. 2008; LOUIE, et al. 2009; BICER, et al. 2013).

Atualmente sabe-se que os coronavírus humanos são reconhecidos como causa comum de infecções do trato respiratório superior, tendo uma associação menor ao trato respiratório inferior. Em relação ao resfriado comum é considerado o segundo agente mais frequente podendo representar até 30% destes casos em períodos epidêmicos. No entanto aproximadamente 20% das infecções do trato respiratório são de origem desconhecida e o coronavírus pode ser responsável por algumas destas infecções. (BAKER, 2004; VAN DER HOEK, et al. 2010; ZAKI, et al. 2012).

O Bocavirus humano (HBoV) foi descrito pela primeira vez em 2005, por Allander *et al*, em secreção nasofaríngea de crianças com infecção do trato respiratório, por isso sugere-se que desempenhe um papel importante em infecções deste tipo (ALLANDER, et al. 2005; CHEN, et al. 2010). É um patógeno respiratório recentemente reconhecido, no entanto estudos mostram que afetam principalmente crianças com idade inferior a dois anos e que há altas taxas de co-infecção em indivíduos sintomáticos. Em nível mundial, verificou-se sua prevalência em amostras respiratórias de crianças com infecção do trato respiratório inferior variando de 1,5% a 19% (ALLANDER, 2008). Os estudos soroepidemiológicos sobre HBoV estão em concordância com os dados de estudos que utilizaram o PCR como método de detecção, mostrado ser um patógeno muito comum durante a infância (ENDO, et al. 2007; KAHN, et al. 2008; JARTTI, et al. 2012).

## **2.2.6 *Streptococcus pneumoniae***

### *2.2.6.1 Histórico*

Foi um dos primeiros patógenos a ser descoberto e suas propriedades microbiológicas foram extensivamente investigadas. A bactéria foi isolada pela primeira vez em 1880 por Pasteur na França e ao mesmo tempo por Sternberg nos Estados Unidos, tendo Pasteur publicado primeiro sua descoberta em 1881, alguns meses antes de Sternberg. Em 1897 os pesquisadores franceses Bezançon e Griffon perceberam diferenças nas reações de aglutinação antipneumocócicas, usando soro de coelho, concluindo existir cepas diferentes de *S. pneumoniae*. Desde então vários pesquisadores como Neufeld e Händel, na Alemanha,

Dochez, Gillespie e Cooper, em Nova York, têm identificado diferentes sorotipos (HENRICHSEN, 1999).

#### 2.2.6.2 Aspectos gerais

Frequentemente referido como “pneumococo”, este microrganismo reside na superfície da mucosa do trato respiratório superior. Embora a colonização neste sítio pareça ser assintomático, se o microrganismo migrar para locais normalmente estéreis, uma rápida resposta inflamatória que se segue resulta em doença (KADIOGLU, et al. 2008). O *S. pneumoniae* pertence a ordem *Lactobacillales*, família *Streptococcaceae* do gênero *Streptococcus* (KONEMAN, 2008). É responsável por várias doenças, incluindo infecções leves e comuns como: otite média, sinusite e pneumonia, e doenças mais graves como as doenças pneumocócicas invasivas (DPI), bacteremia e meningite. Entre essas infecções, a pneumonia ganha destaque devido as suas altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, especialmente em crianças. Assim todas as doenças pneumocócicas começam com o estabelecimento da colonização, isto é, de um estado de portador (KADIOGLU, et al. 2008; SONG, et al. 2013A).

É sugerido que a disseminação pessoa-a-pessoa ocorra através do contato direto com as secreções de indivíduos colonizados. A colonização é mais comum na infância e a maioria das crianças adquirem uma ou mais cepas sucessiva ou simultaneamente (HENRICHSEN, 1995). As taxas de colonização variam muito entre os 94 sorotipos capsulares pneumocócicos conhecidos (KADIOGLU, et al. 2008).

O pneumococo contribui com aproximadamente 60-75% das pneumonias bacterianas na infância, destacando-se também no subgrupo de crianças que eventualmente, morrem da doença (ANDRADE, et al. 2011; RUDAN, et al. 2013). Pneumonias imunopreveníveis (ou seja, aquelas causadas por *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b, e vírus influenza) são responsáveis por pelo menos um terço dos episódios graves e dois terços das mortes (WALKER, et al. 2013).

O *S. pneumoniae* é uma bactéria Gram-positiva, catalase-negativa, que se apresenta como cocos em forma de lança e podem estar arranjados aos pares ou dispostos em pequenas cadeias. São conhecidas como  $\alpha$ -hemolíticas devido à expressão da pneumolisina, proteína responsável pela degradação da hemoglobina nas culturas em meio contendo sangue,

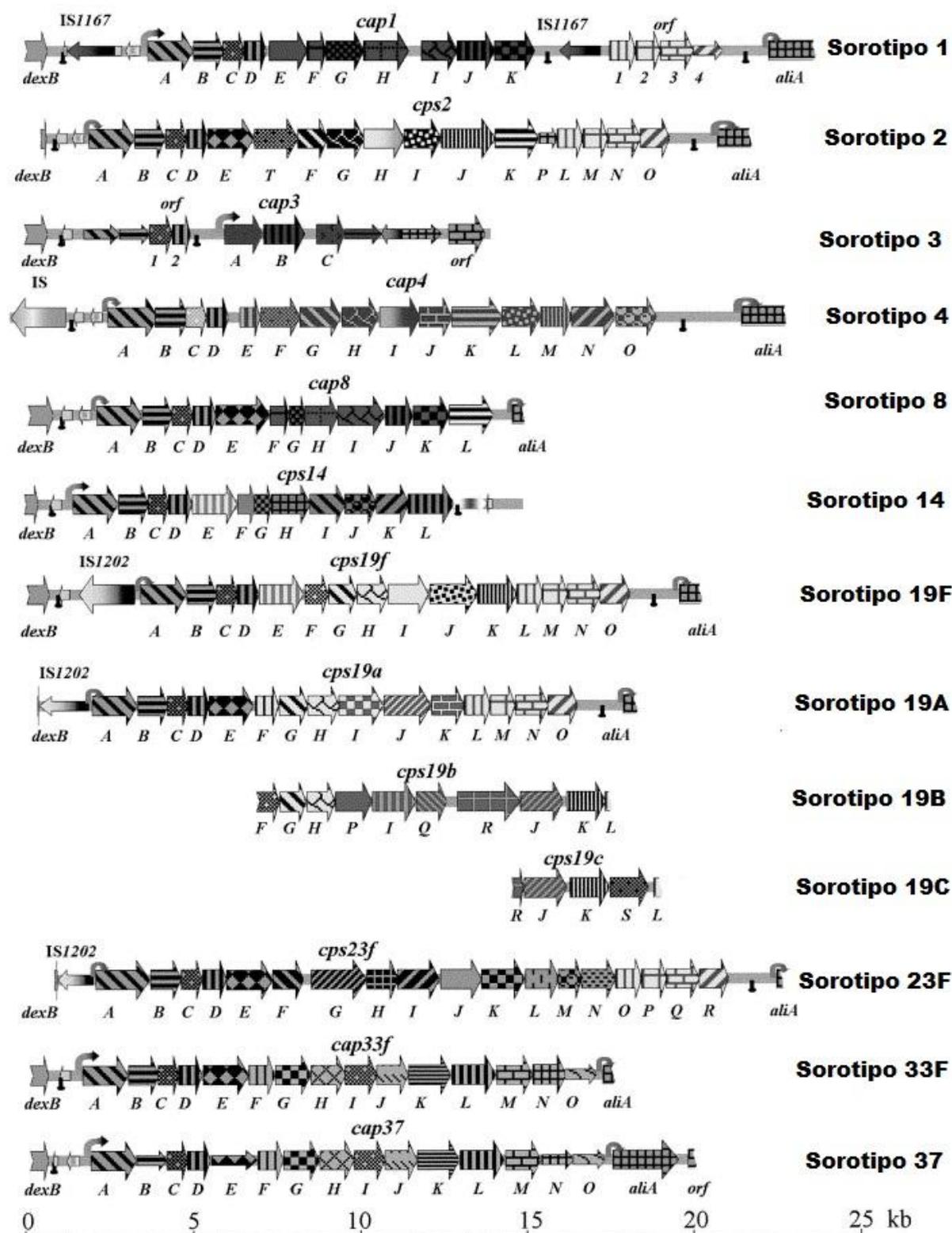
resultando em uma coloração esverdeada ao redor da colônia, têm o crescimento estimulado por um aumento na concentração de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), são solúveis na presença de sais biliares e sensíveis à optoquina (KONEMAN, 2008; PLETZ, et al. 2008; SONG, et al. 2013A).

Sua cápsula de polissacarídeo antifagocítica além de ser um fator essencial de virulência, permite classificar este habitante normalmente comensal da nasofaringe. A sorotipagem convencional é feita utilizando a reação de Quellung, que se baseia na capacidade de o soro hiperimune específico reagir com a cápsula da bactéria. Os sorotipos são classificados seguindo o sistema de nomenclatura dinamarquesa onde o grupo é denominado por números e o tipo por letras maiúsculas e a combinação entres eles identifica cada sorotipo (HENRICHSEN, 1979; HENRICHSEN, 1995; DIAS, et al. 2007; PLETZ, et al. 2008).

Atualmete são conhecidos 94 sorotipos capsulares que incluem os recentemente descobertos 6C, 6D, 11E e 20A/20B, porém, nem todos os sorotipos são igualmente patogênicos, cada sorotipo se distingue pela resposta sorológica, estrutura química do polissacarídeo e outras mutações genéticas relacionadas, sendo assim, a cápsula pneumocócica desempenha um papel importante na patogênese e desenvolvimento de vacinas (PARK, et al. 2007; JIN, et al. 2009; CALIX, et al. 2012A; CALIX, et al. 2012B; SONG, et al. 2013A).

A produção da cápsula é controlada por genes de síntese de polissacarídeos capsulares localizados no *locus cps*, normalmente com a mesma organização genética geral, esse *locus* está entre os genes conservados, que não participam da biossíntese da cápsula, dexB e aliA. Os primeiros quatro genes (*cpsA*, *cpsB*, *cpsC* e *cpsD*) são conservados em quase todos os sorotipos (Figura 1), sendo apenas o gene *cpsA* conservado em mais de 90% dos tipos capsulares sequenciados, enquanto que as partes centrais do *locus* contém os genes específicos de cada sorotipo e servem como base para a diferenciação dos pneumococos por técnicas baseadas em PCR (PAI, et al. 2006).

Devido ao alto custo do antissor, subjetividade na interpretação e as dificuldades intrínsecas, a utilização da sorotipagem convencional, utilizando a reação de Quellung, fica limitada a poucos laboratórios altamente especializados. O surgimento de técnicas de sorotipagem utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), vem apresentando-se como forma de superar algumas dessas limitações (PAI, et al. 2006; DIAS, et al. 2007).



**Figura 1:** Organização genética da região do DNA do *S. pneumoniae* entre os genes *dexB* e *aliA*, que contém os genes capsulares de diferentes genótipos. As regiões com mais de 90% de nucleotídeos idênticos são representados pelo mesmo sombreamento. Adaptado de García et al. 2000.

### 2.2.6.3 Epidemiologia

Em termos de colonização da nasofaringe, patogenicidade e apresentação clínica, a distribuição dos sorotipos capsulares do *S. pneumoniae* pode variar geograficamente e temporalmente. A colonização pneumocócica, em geral, ocorre precocemente, aproximadamente 30-60% das crianças encontram-se colonizadas nos primeiros anos de vida, no entanto, em algumas populações, já foi relatada uma prevalência superior a 90%, essa taxa diminui progressivamente até atingir uma taxa de 1-10% em adultos (SONG, et al. 2013B; HILL, et al. 2008; PLETZ, et al. 2008).

De todos os sorotipos de *S. pneumoniae* conhecidos, sabe-se que alguns estão mundialmente mais associados às doenças pneumocócicas invasivas, sendo responsáveis por mais de 80% destas, são eles: 1, 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19F, e 23F, já na América Latina, 13 sorotipos correspondem a mais de 85% dos isolados invasivos. Em crianças jovens, o número de sorotipos é mais limitado, os sorotipos 6, 14, 18, 19, e 23F são predominantes. Em relação à otite média aguda, os sorotipos globalmente mais comuns são: 3, 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F e 23F, sendo os sorotipos 1, 5 e 7F raramente associados a esta infecção (DIAS, et al. 2007; LYNCH & ZHANEL, 2010).

### 2.3 Coinfecção entre vírus respiratórios e *S. pneumoniae*

O trato respiratório superior humano é reservatório de uma comunidade diversificada de potenciais patógenos comensais como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Staphylococcus aureus*, que ocasionalmente se tornam patógenos causadores de doenças infecciosas, para isso, precisam colonizar o nicho da nasofaringe através de um processo dinâmico (BLASER & FALKOW, 2009; BERGH, et al. 2012; BOSCH, et al. 2013).

Episódios de aquisição viral são conhecidos por predispor a doença invasiva bacteriana secundária e pneumonia por perturbarem o equilíbrio deste ecossistema. A infecção causada pelos vírus lesa a mucosa do trato respiratório, prejudicando seus mecanismos locais de defesa e favorecendo o surgimento de infecções secundárias. A camada epitelial da mucosa do trato respiratório é a primeira linha de defesa contra um invasor bacteriano, a perda da

função desta barreira pode levar a entrada de agentes patogênicos. Os vírus geralmente replicam-se intracelularmente e, posteriormente, podem desorganizar processos celulares ou lisar as células infectadas que por sua vez levam a desnudação da camada epitelial e exposição da membrana basal. Estes desequilíbrios podem resultar em crescimento excessivo e invasão por patógenos, causando doenças respiratórias ou invasivas, especialmente em crianças com um sistema imunológico imaturo (BERGH, et al. 2012; BOSCH, et al. 2013; MINA, et al. 2014).

As associações entre bactérias e vírus nas infecções do trato respiratório podem estar presente em até dois terços dos casos. A infecção por *S. pneumoniae* após a infecção por vírus respiratórios está associada a maior gravidade da doença e a maior frequência de hospitalização (CASHAT-CRUZ, et al. 2005; ISHIZUKA, et al. 2003).

A aderência do *S. pneumoniae* às células epiteliais é um passo importante no desenvolvimento de infecção do trato respiratório com essa bactéria. Estudos *in vitro* e em animais têm reforçado esta hipótese ao observar o aumento da adesão de *S. pneumoniae* após danos ao epitelial traqueal, como a descamação das células ciliadas e não ciliadas, causados por infecções virais, fornecendo algumas pistas para explicar o sinergismo entre as infecções respiratórias virais e subsequentes infecções bacterianas (ISHIZUKA, et al. 2003; HAMENT, 2005; MCCULLERS, 2006). Em humanos já foi verificado que 40% das crianças com infecções graves por VSR apresentavam concomitantemente infecção bacteriana do trato respiratório inferior (THORBURN, 2006).

Talvez a interação vírus-bactéria mais conhecida seja o sinergismo entre o vírus influenza e o *S. pneumoniae*, embora só a infecção pelo vírus possa ser grave, a mortalidade aumenta drasticamente quando ocorre uma super-infecção bacteriana. Essa relação já foi observada em experimentos *in vitro*. Pesquisas também relatam como exemplo a gripe espanhola (pandemia de 1918-1919) onde a maioria das mortes ocorreram por pneumonia pneumocócica secundária (HAMENT, 2005; MCCULLERS, 2006; THORBURN, 2006; BOSCH, et al. 2013). Estudos recentes também evidenciaram que pacientes com infecção pelo vírus influenza que desenvolveram pneumonia apresentaram 16% de hemocultura positiva para bactérias, sendo 70% por *S. pneumoniae* (ANDRADE, et al. 2011).

Diante das evidências da influência dessas interações nas doenças do trato respiratório inferior é de grande relevância detectar os microgarnismos com potencial para causar

pneumonias na população infantil, ainda mais no cenário de introdução da vacina pneumocócica no calendário vacinal infantil como estratégia no combate a mortalidade nessa faixa etária.

## 2.4 Vacina

Durante muito tempo a penicilina foi a droga de escolha para o tratamento das doenças pneumocócicas, no entanto, devido a disseminação de cepas resistentes a essa droga as vacinas tornaram-se a principal prevenção contra o pneumococo, o que representa um progresso significativo no combate a doenças pneumocócicas, principalmente em países em desenvolvimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010B; WHO, 2012).

No Brasil, os esforços contra as doenças pneumocócicas vêm desde a década de 1990, quando foram disponibilizados nos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais (CRIE) as vacinas para grupos especialmente suscetíveis ao pneumococo. A vacina pneumocócica 23-valente passou a ser aplicada em idosos a partir de 60 anos que viviam em instituições fechadas. Devido a estudos onde demonstrou-se que essa vacina não era tão eficaz em crianças menores de dois anos a vacina pneumocócica 7-valente (conjugada) passou a ser incorporada pelo Ministério da Saúde em 2001, também em grupos em condições clínicas especiais nos CRIE. A partir de 2010, foi que começou a imunização ativa através da incorporação da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário vacinal básico da criança (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010B)

As primeiras vacinas que surgiram eram orientadas contra o polissacarídeo capsular dos pneumococos (CPS), o que fornece proteção estritamente sorotipo-específica, além disso, são pouco imunogênicas em crianças jovens. Esse fator negativo foi superado quando passou a ser conjugada com proteínas transportadoras, que é o caso da vacina pneumocócica-7 valente e vacina pneumocócica-10 valente, esta última é constituída por dez sorotipos de pneumococos, sendo oito, conjugados à proteína D de *Haemophilus influenzae* e dois à carreadores de toxóide diftérico (DT) e de toxóide tetânico (TT ou T), no entanto a vacina continua a fornecer protecção estritamente sorotipo-específico (MORETTI, et al. 2007; KADIOGLU, et al. 2008, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010B).

### 3 HIPÓTESES

- ✓ A introdução da vacina pneumocócica 10 valente conjugada reduz a detecção de *S. pneumoniae* em secreção nasofaríngea de crianças com pneumonias no período de desenvolvimento do estudo.
- ✓ A taxa de detecção de *S. pneumoniae* será menor com o passar dos anos (no período de estudo), mas não haverá redução na detecção de vírus nos casos analisados no mesmo período.
- ✓ A circulação de sorotipos de *S. pneumoniae* existentes na vacina será reduzida progressivamente, havendo uma substituição desses sorotipos por outros não incluídos na vacina.

## 4 OBJETIVO GERAL

Determinar a taxa de detecção de diversos vírus respiratórios e *S. pneumoniae* em aspirados de nasofaringe de crianças com pneumonia após a introdução da vacina pneumocócica 10 valente conjugada na vacinação das crianças.

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar os vírus presentes nas secreções de nasofaringe de crianças com pneumonias, sejam elas positivas ou negativas para *S. pneumoniae*.
- ✓ Verificar os vírus que são detectados mais frequentemente em associação ao *S. pneumoniae*.
- ✓ Identificar os sorotipos de *S. pneumoniae* circulantes, verificando qual a presença de sorotipos existentes ou não na vacina pneumocócica 10 valente conjugada.
- ✓ Verificar a distribuição da circulação do *S. pneumoniae* ao longo do período de estudo em relação às estações chuvosas e secas.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Descrição do estudo**

#### **5.1.1 *Tipo de estudo***

Esse foi um estudo descritivo, transversal, retrospectivo e prospectivo realizado no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013.

#### **5.1.2 *População e local de estudo***

Pacientes de 0 a 16 anos de idade, de ambos os sexos, atendidos nos setores de emergência e enfermaria do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), em Fortaleza – Ceará, com sinais e sintomas de infecção aguda do trato respiratório inferior. O HIAS é o principal hospital pediátrico de nível terciário do estado do Ceará.

#### **5.1.3 *Critérios de inclusão***

Pacientes com sinais e sintomas de infecções agudas do trato respiratório inferior, pneumonia, cujas manifestações clínicas iniciaram há no máximo sete dias.

#### **5.1.4 *Critérios de exclusão***

Pacientes em uso de antibiótico.

#### **5.1.5 *Aspectos éticos***

Este estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do HIAS em 17 de Dezembro de 2009 (ofício nº070/09) (Anexo A) e em 12 de Junho de 2013 (ofício nº024/2013) (Anexo B).

#### **5.1.6 *Material clínico e coleta de dados***

A coleta dos dados e do material clínico foi realizada nos turnos da manhã e/ou da tarde, de segunda a sexta-feira, por membros da equipe do Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Ceará, que fizeram busca ativa nos setores de emergência e enfermarias do HIAS.

Antes da coleta da amostra o responsável pelo paciente era esclarecido a respeito do procedimento e do estudo, autorizando a continuidade do processo ao assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A). A ficha epidemiológica (Apêndice B) era preenchida pelo aluno ao entrevistar o responsável pelo paciente. Os dados de exame físico, exames realizados e tratamento instituído foram obtidos da folha de atendimento ou do prontuário do paciente nos casos de internamento. As informações obtidas eram arquivadas em planilhas do Excel formando um banco de dados.

### **5.1.7 Coleta das amostras**

O espécime clínico, aspirado de nasofaringe (ANF), foi colhido de uma das narinas da criança através de aspiração, utilizando uma sonda de aspiração traqueal nº 6 acoplada a uma seringa de 20 mL, segundo a técnica de Gardner; McQuillin, 1980. A sonda era introduzida em uma das narinas até a altura da nasofaringe (aproximadamente metade da distância compreendida entre o nariz e o ouvido da criança). Caso não fosse coletado material suficiente o procedimento era repetido na outra narina. Após a coleta, a amostra era identificada com o nome do paciente e colocada em caixa térmica com gelo reciclável, para ser transportada ao final de cada turno de coleta para o Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Ceará para processamento.

## **5.2 Diagnóstico Laboratorial**

### **5.2.1 Processamento das amostras**

No Laboratório de Virologia a amostra era dividida em duas alíquotas, uma para pesquisa de antígenos virais e outra para pesquisa de *S. pneumoniae* no Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal do Ceará. As alíquotas para pesquisa de antígenos virais eram transferidas para um tubo de centrífuga de poliestireno, com capacidade para 15 mL, contendo 2mL de Meio Essencial Mínimo com sais de Earle (MEM-E), adicionado de penicilina-

estreptomicina (10.000 U/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina), L-glutamina a 2 % e bicarbonato de sódio a 7,5 %. Para a quebra do muco e liberação das células presentes nessas secreções, as amostras eram homogeneizadas através de movimentos de aspiração e ejeção da solução com auxílio de uma pipeta Pasteur conectada a uma pêra de aspiração.

Os tubos eram centrifugados a 1.500 rpm (400xg), por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado e o sedimento diluído em tampão salina fosfato (PBS), em quantidade variável de acordo com o volume do sedimento. A solução homogeneizada como descrita anteriormente era, então, dispensada em lâminas para imunofluorescência indireta (IFI). De cada amostra, três lâminas eram preparadas para imunofluorescência, sendo uma para triagem de amostras positivas e negativas, uma para realização de imunofluorescência específica, em caso de amostra positiva na triagem e a última era utilizada como reserva. A amostra processada era colocada em três orifícios, um central e nos dois da extremidade oposta, na lâmina de triagem e nos orifícios externos das duas outras lâminas para teste específico e reserva. A secagem das amostras nas lâminas era realizada em estufa a 37 °C, e a fixação, em acetona a 4 °C por 10 minutos. Após evaporação da acetona, as amostras eram submetidas à reação de IFI.

A alíquota usada para pesquisa de *S. pneumoniae* era semeada em placa com meio Columbia agar (DIFCO) suplementado com sangue desfibrinado de carneiro a 5 % e gentamicina 5 µg/ml e em seguida levadas ao Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal do Ceará onde eram incubados a  $36 \pm 1$  °C em atmosfera de microaerofilia, por 24 horas.

### 5.2.2 Reação de imunofluorescência indireta

O método de IFI foi empregado para detecção rápida de antígenos do VSR, adenovírus, influenza A e B e parainfluenza 1, 2 e 3. Para isso utilizou-se o *Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification Kit* (Chemicon International Inc., EUA).

Na lâmina de triagem, adicionava-se 8 µL de um *pool* AcM contra os vírus identificados pelo *kit*, em um dos orifícios e, no outro, 8 µL do anticorpo de camundongo não infectado, o controle negativo da reação. As lâminas eram incubadas em câmara úmida, a 37 °C, por 30 minutos. A seguir, elas eram lavadas com PBS-Tween por 5 minutos e submetidas à secagem na estufa. O mesmo volume (8 µL) do segundo anticorpo (anticorpo de cabra anti-IgG de

camundongo conjugado à fluoresceína) era, então, colocado nos dois orifícios. O tempo e as condições de incubação eram os mesmos da etapa anterior. Após a secagem final das lâminas, elas eram montadas com lamínulas utilizando-se o líquido de montagem do próprio *kit*. A leitura era realizada em microscópio de fluorescência (Modelo BX-40 marca Olympus). Considerava-se como resultado positivo a presença de inclusões fluorescentes características nas células respiratórias.

### **5.2.3 Isolamento bacteriano e identificação de *S. pneumoniae***

Após o período de incubação foram selecionadas colônias, isoladas, planas com uma zona cinza-esverdeada ao redor ( $\alpha$ -hemólise) e novamente semeada em placa com meio Columbia agar (DIFCO) suplementado com sangue desfibrinado de carneiro a 5% e gentamicina 5  $\mu\text{g/ml}$  e incubadas a  $36 \pm 1$  °C em atmosfera de microaerofilia, por 24 horas, a fim de gerar uma maior massa celular bacteriana para realização da coloração de Gram, dos testes com disco de optoquina (5  $\mu\text{g}$ ) e o teste da solubilidade em bile em solução de deoxicolato de sódio a 10%.

Eram considerados *S. pneumoniae* aquelas colônias que á microscopia apresentavam a forma de diplococos Gram positivo, sensibilidade à optoquina e solubilidade em bile.

### **5.2.4 Estocagem das amostras**

Após a identificação das cepas as amostras eram mantidas estocadas em caldo BHI com 16% (vol/vol) de glicerol e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior genotipagem capsular.

### **5.2.5 Extração do DNA de *S. pneumoniae***

Para a realização da extração do DNA as cepas de pneumococos foram retiradas do estoque e semeados em placas com meio BHI ágar (OXOID) suplementado com sangue desfibrinado de carneiro adicionado de 5  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina e incubados durante 24 horas a  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , em microaerofilia. As células bacterianas, crescidas na placa, foram transferidas para 2ml de BHI caldo que foram incubadas  $36 \pm 1$  °C durante 24 horas. A extração do DNA foi realizada conforme as recomendações do DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen® Group, 2011).

### 5.2.6 Primers

Trinta e nove pares de *primers* foram usados para atingir os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A/B, 7F, 7C, 8, 9N, 9V, 10A, 10F, 11A, 12F, 13, 14, 15A, 15B/C, 16F, 17F, 18, 19A, 19F, 20, 21, 22F, 23A, 23B, 23F, 24, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F, 38 e 39. Um par de primer foi incluído (primers *cpsA-f* e *cpsA-r*) como controle interno que tem como alvo o lócus *cpsA* presente em todos os pneumococos. (PAI, et al. 2006; DIAS, et al. 2007).

### 5.2.7 PCR Multiplex

Os *primers* foram utilizados em oito reações de PCR multiplex, e uma reação, para diferenciar os sorotipos 6A/B do 6C. Os *primers* foram agrupados com base na distribuição dos sorotipos dos pneumococos invasivos mais encontrados. Em cada reação foram colocados doze pares de *primers* que tinham como alvo regiões sorotipo-específicas de doze diferentes sorotipos. Foi também incluída em cada reação como controle positivo interno a cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619. (PAI, et al. 2006; DIAS, et al. 2007).

Os *PCRs* foram realizados em solução contendo 25 µl, com cada mix da reação contendo: HotStarTaq® Master Mix Kit e os 12 *primers*. Ciclos térmicos realizados em GenePro Thermal Cycler (Bioer Technology) nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 15 minutos seguido de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos (desnaturação), 54°C por 90 segundos (anelamento) e 72°C por 60 segundos (extensão), 72°C por 10 minutos (extensão final) (PAI, et al. 2006; DIAS, et al. 2007).

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2% (Fisher Bio Reagents) em 1X tampão TBE (100ml) (40 mM Tris, 20 mM de ácido acético glacial, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 100 V por 1 hora e 30 minutos. Os géis foram revelados com brometo de etídio (0,5 µg/ml), as imagens foram fotografadas e analisadas no ImageQuant 300 (GE Healthcare Life Sciences). Os tamanhos dos produtos de PCR foram comparados com marcador de peso molecular padrão (50-bp ladder; Fisher Bio Reagents.) (PAI, et al. 2006; DIAS, et al. 2007).

### 5.2.8 *Análise estatística*

Para análise estatística foi utilizado o software IBM SPSS Statistics versão 20 (Windows) para realizar os principais testes estatísticos utilizados nas tabelas 2X2. Em todos os casos foram considerados significantes os resultados com  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Características gerais da população de estudo

Durante o período de estudo foram analisadas 781 amostras coletadas da população estudada, sendo 286 (36,62%), 235 (30,09%) e 260 (33,29%) coletadas nos anos de 2011, 2012 e 2013, respectivamente.

As características gerais, sexo, idade, setor de atendimento, procedência e destino da população de estudo são apresentadas na tabela 1.

As crianças do sexo masculino representaram a maioria da população estudada (60,31%) ( $p = 0,0000$ ).

Em relação à idade foram coletadas amostras de pacientes entre zero e 215 meses, sendo a média de idade de 23,7 meses. Com relação ao sexo a idade média dos pacientes masculinos foi de 21,8 meses, enquanto que pacientes do sexo feminino tiveram idade média de 26,7 meses. Predominaram no estudo crianças até dois anos de idade (73,24%).

A maior parte da população de estudo foi representada por pacientes atendidos na emergência que correspondeu a 56,98%. Dos pacientes hospitalizados seis (0,77%) precisaram de atendimento na UTI.

Embora Fortaleza tenha sido o município do qual a maioria dos pacientes procederam, 598 (76,57%), um número considerável de crianças, 183 (23,43%), procederam de outros municípios do estado do Ceará.

Quanto ao destino dado às crianças que compuseram a população de estudo uma parte retornou para casa após atendimento médico, mas a maioria (402 - 51,47%) necessitou de hospitalização, sendo 366 (46,86%) no próprio HIAS e 36 (4,61%) encaminhadas para outro hospital.

**Tabela 1:** Características da população de estudo.

	Quantidade	Percentual (%)
<b>Sexo</b>		
Masculino	471	60,31
Feminino	310	39,69
Total	781	100
<b>Idade (meses)</b>		
0-12	379	48,53
13-24	193	24,71
25-36	64	8,19
37-48	44	5,63
49-60	27	3,46
>60	74	9,48
Total	781	100
<b>Sector de atendimento</b>		
Emergência	445	56,98
Enfermaria	336	43,02
Total	781	100
<b>Procedência</b>		
Fortaleza	598	76,57
Outra cidade	183	23,43
Total	781	100
<b>Destino</b>		
Casa	379	48,53
Hospitalização	402	51,47
Total	781	100

Na tabela 2 são apresentadas as comorbidades e os fatores de risco para infecções respiratórias agudas na população de estudo. A maioria das crianças incluídas no estudo não apresentou comorbidades. Aproximadamente  $\frac{1}{4}$  da população estudada tinha algum tipo de comorbidade, sendo a asma (57 - 7,3%) e a cardiopatia (52 – 6,66%) as mais frequentemente referidas. A presença de comorbidades associadas esteve presente em 20 (2,56%) crianças.

A existência de um familiar com quadro de IRA, 380 (48,66%), e a existência de fumante em casa, 157 (20,1%), foram os fatores de risco predominantes na população de estudo para apresentação de infecção respiratória aguda. A associação de dois ou mais fatores de risco esteve presente em 185 (23,69%) crianças.

**Tabela 2:** Características da população de estudo quanto à presença de comorbidades e fatores de risco para IRA.

	Quantidade	Percentual (%)
<b>Comorbidades</b>		
Nenhuma	585	74,9
Asma	57	7,3
Cardiopatia	52	6,66
Doença neurológica	35	4,48
Refluxo gastroesofágico	22	2,82
Pneumopatia crônica	8	1,02
Imunossupressão	2	0,26
Associações	20	2,57
Total	781	100
<b>Fatores de risco</b>		
Nenhum	225	28,81
Familiar com IRA	380	48,66
Fumante em casa	157	20,1
Não amamentado	95	12,16
Frequente creche	92	11,78
Prematuridade	41	5,25

A presença de mais de um sintoma é geralmente referido ou observado em crianças com pneumonia, sendo na população de estudo a tosse, febre, dispneia e coriza os sinais e sintomas mais comuns (tabela 3).

**Tabela 3:** Sinais e sintomas apresentados pela população de estudo.

Sinais e sintomas	Quantidade	(%)
Tosse	750	96,03
Febre	662	84,76
Dispneia	661	84,64
Coriza	645	82,59
Obstrução nasal	542	69,4
Espirros	450	57,62
Tiragem	397	50,83
Hiporexia	322	41,23
Vômitos	265	33,93
Diarreia	112	14,34
Convulsões	24	3,07
Conjuntivite	5	0,64
Exantema	3	0,38

Alterações na radiografia de tórax foram observadas em 726 pacientes (92,96%), sendo a condensação e o infiltrado intersticial os achados mais comuns 623 (79,77%). Não foi solicitada a radiografia de tórax para 45 (5,76%) pacientes. Achados radiográficos menos comuns foram: hiperinsulflação 7 (0,9%), derrame pleural 1 (0,13%), atelectasia 1 (0,13%) e outros 10 (1,28%). A radiografia foi considerada normal em 10 (1,28%) pacientes. A associação entre alterações radiológicas foi observada em 84 (10,76%) pacientes.

Quanto ao tratamento instituído o antibiótico e o aerosol foram os mais prescritos, 79,39% e 70,55% respectivamente, antitérmico (49,42%) e corticoide (40,85%) também foram utilizados pelos pacientes, e em menor quantidade o salbutamol (7,55%).

## 6.2 Detecção dos microrganismos pesquisados

A detecção dos vírus respiratórios e *S. pneumoniae* pesquisados variou durante os anos estudados, tendo no final 441 (56,47%) amostras negativas para ambos grupos de microrganismos, 199 (25,48%) foram positivas para pelo menos um vírus pesquisado, 184 (23,56%) foram isoladas *S. pneumoniae* e 43 (5,51%) apresentaram detecção mista (pelo menos um vírus e pneumococo) (Tabela 4).

Houve uma queda na detecção de *S. pneumoniae* no decorrer dos anos estudados, sendo a taxa inicial de 38,11% em 2011, enquanto que no ano de 2013 esta taxa foi de 10%.

**Tabela 4:** Detecção do total de vírus respiratórios e *S. pneumoniae* na população de estudo.

	Negativo		Pelo menos um vírus		<i>S. pneumoniae</i>		Detecção Mista		Total
		(%)		(%)		(%)		(%)	
2011	130	45,45	77	26,92	109	38,11	30	10,49	286
2012	166	70,64	25	10,64	49	20,85	5	2,13	235
2013	145	55,77	97	37,31	26	10	8	3,08	260
Total	441	56,47	199	25,48	184	23,56	43	5,51	781

Os vírus por sua vez foram detectados em 199 (25,48%) das amostras analisadas, sendo o vírus mais frequentemente detectado o VSR, presente em 130 delas (57,52%). Em 2012 houve uma menor detecção dos vírus pesquisados, exceção feita para o vírus influenza. Em 2013 o número de vírus detectados superou o registrado em 2011 embora tenha havido um decréscimo no número de pneumonias registradas em 2013, quando comparamos a 2011 (Tabela 5). O vírus influenza foi detectado em número superior ao de vírus parainfluenza e adenovírus no período total de estudo, embora apenas no ano de 2013 sua detecção tenha sido significativamente aumentada em relação ao ano de 2012 ( $p=0,0030$ ). O vírus influenza A representou 92% dos vírus influenza detectados. A detecção de adenovírus foi menor no ano de 2013 se comparada a de 2011 ( $p=0,0000$ ) e um menor percentual de casos positivos para adenovírus no ano de 2012 quando comparado a 2013 ( $p=0,0000$ ). Quanto aos vírus parainfluenza não houve uma diferença estatisticamente significativa no seu percentual de casos positivos entre os anos de estudo.

**Tabela 5:** Detecção de vírus respiratórios durante o período de estudo

	VSR	(%)	Influenza	(%)	Parainfluenza	(%)	Adenovírus	(%)	Total
2011	45	56,96	5	6,33	14	17,72	15	18,99	79
2012	10	38,46	8	30,77	7	26,92	1	3,85	26
2013	75	61,99	24	19,83	10	8,26	12	9,91	121
Total	130	57,52	37	16,37	31	13,71	28	12,39	226

Foram detectadas 184 (23,56%) amostras positivas para *S. pneumoniae*, sendo 43 (23,37%) com co-detecção viral e 141 (76,63%) sem a presença de vírus. As co-detecções entre os diversos vírus pesquisados e o *S. pneumoniae* nos três anos de estudo são apresentadas na tabela 6. A co-detecção entre o *S.pneumoniae* e o VSR foi a mais frequente, representando 60,47% deste tipo de co-detecção.

**Tabela 6:** Detecção mista (vírus e *S. pneumoniae*) no estudo.

	Número	(%)	p valor
<i>S. pneumoniae</i> + VSR	26	60,47	0,5891
<i>S. pneumoniae</i> + parainfluenza	9	20,93	0,4014
<i>S. pneumoniae</i> + adenovírus	4	9,3	0,6059
<i>S. pneumoniae</i> + influenza	3	6,98	0,0049
<i>S. pneumoniae</i> + adenovírus + parainfluenza	1	2,33	-
Total	43	100	-

As co-detecções exclusivamente virais são apresentadas na tabela 7. Elas foram sempre, no máximo entre dois vírus (92,31%). A co-detecção viral mais frequente foi VSR e influenza, que representou 38,46% deste tipo de co-detecção.

**Tabela 7:** Co-detecção de vírus no estudo.

	Número	(%)
VSR + influenza	10	38,46
Adenovírus + influenza	5	19,23
Adenovírus + parainfluenza	5	19,23
VSR + adenovírus	3	11,54
VSR + adenovírus + influenza	2	7,69
Influenza + parainfluenza	1	3,85
Total	26	100

### 6.3 Estado vacinal da população de estudo

Em relação à vacinação, 354 (45,33%) pacientes haviam sido vacinados tanto para o vírus influenza como para *S. pneumoniae*, somados a esses, 114 (14,6%) haviam sido vacinados apenas para o vírus influenza e 105 (13,44%) apenas para *S. pneumoniae*, e 208 (26,63%) pacientes não receberam nenhuma das vacinas citadas. Em relação à vacinação e as detecções não foi possível encontrar significância estatística (Tabela 8).

**Tabela 8:** Detecção de microrganismos pesquisados em relação à vacinação contra influenza e pneumococo.

	<i>S. pneumoniae</i>	Vírus	<i>S. pneumoniae</i> + vírus	Negativo	Total	Odds Ratio 95% IC	<i>p</i> valor
Vacinados com VPC-10	97	89	31	242	459	1,8711 (0,9458 - 3,7015)	0,067
Vacinados com Influenza	103	77	28	260	468	1,2642 (0,6639 - 2,4076)	0,4747
Não vacinados	29	50	10	119	208	0,8264 (0,3999 - 1,7081)	0,6063

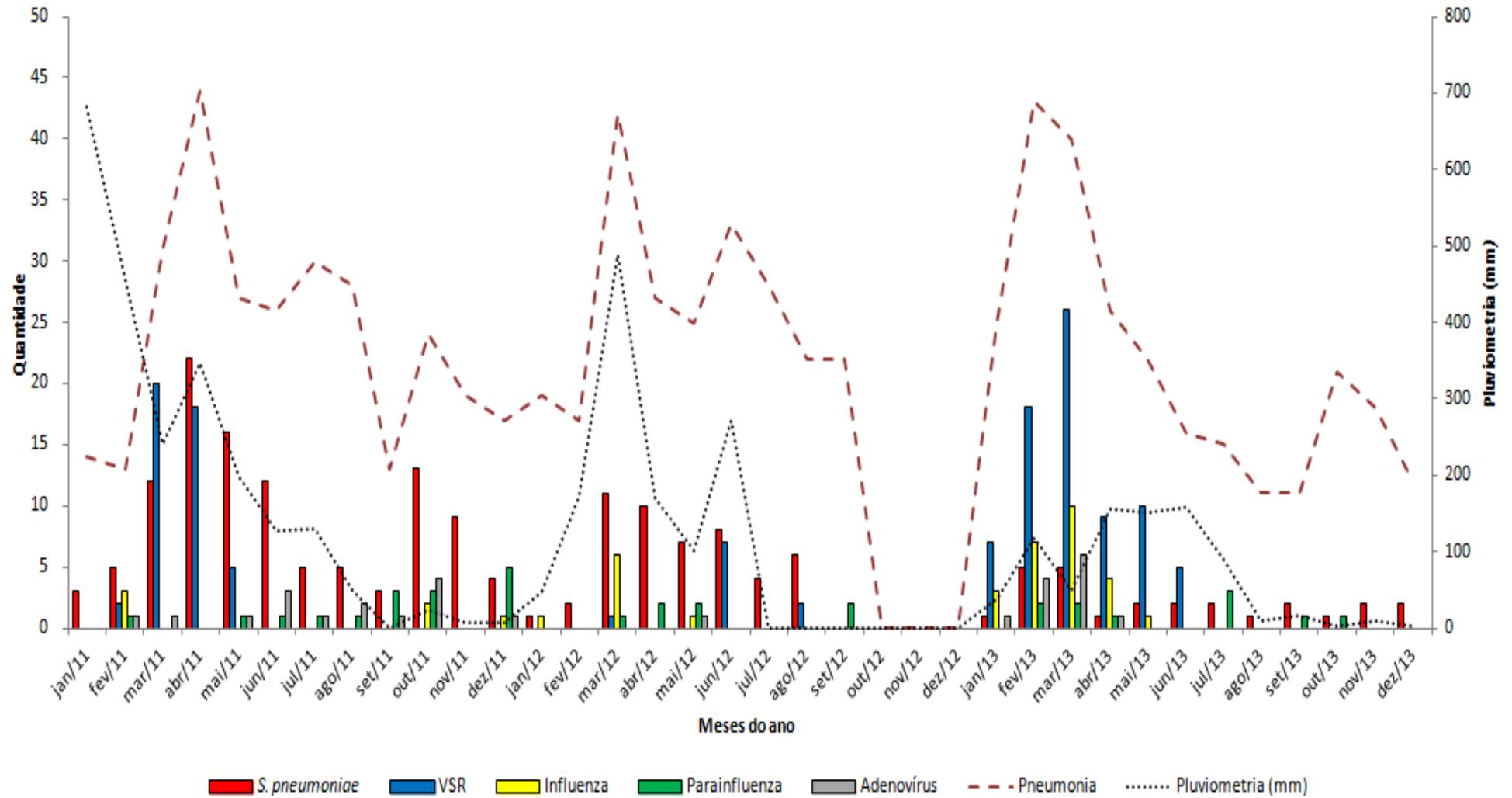
### 6.4 Sazonalidade das pneumonias e de microrganismos detectados

As pneumonias distribuíram-se ao longo de cada ano, havendo uma queda no número de casos incluídos no estudo em 2012. Nos três anos de estudo houve um pico na ocorrência de pneumonia no primeiro semestre. Um segundo pico de pneumonias, menor que o observado no primeiro semestre de cada ano, foi observado nos anos de 2011 e 2013, nos meses de setembro, outubro e novembro. Houve uma correlação positiva entre os índices pluviométricos e o total de casos positivos de pneumonia ( $p = 0,0411$ ).

Em relação ao *S. pneumoniae* houve uma redução no percentual de sua detecção ao longo dos anos ( $p = 0,0000$ ), não sendo possível observar alguma relação de sazonalidade com a estação de chuvas.

Há uma maior concentração de casos positivos do VSR nos meses de março a junho ( $p = 0,0000$ ), sendo detectada correlação positiva com os índices pluviométricos e o total de casos positivos para VSR ( $p = 0,0065$ ), desse modo nos meses de maior pluviosidade há também um maior número médio de casos positivos para VSR.

Não foi possível detectar alguma relação de sazonalidade com a ocorrência de casos positivos nem correlação positiva com os índices pluviométricos com os vírus influenza ( $p = 0,3461$ ), parainfluenza ( $p = 0,4189$ ) e adenovírus ( $p = 0,7197$ ) no período estudado.



**Figura 2:** Distribuição dos casos de pneumonia, pluviosidade e detecção dos vírus respiratórios e *S. pneumoniae* na população de estudo.

## 6.5 Características da população positiva para os microrganismos pesquisados

As características da população de estudo onde foi detectado vírus, *S.pneumoniae* ou a combinação destes microrganismos são apresentadas na tabela 9.

A idade média dos pacientes positivos para pneumococo é menor do que dos pacientes negativos ( $p = 0,0000$ ), para a detecção viral a idade média dos pacientes foi menor no caso de detecção do VSR ( $p = 0,0000$ ), adenovírus ( $p = 0,0016$ ) e parainfluenza ( $p = 0,0000$ ), quando comparada com a idade média dos casos negativos, não havendo diferença entre a idade destes e os casos positivos para o vírus influenza ( $p = 0,6831$ ). Em relação ao sexo, pacientes masculinos predominaram em todas as categorias de microrganismos pesquisados ( $p=0,765$ ).

Em relação ao destino grande parcela dos pacientes com detecção de qualquer vírus necessitou de hospitalização (103/153) quando comparado os que tiveram detecção de apenas pneumococo (43/141) ou ambos (17/43).

**Tabela 9:** Distribuição da população de estudo por sexo, idade, comorbidades e destino final em relação aos microorganismos detectados.

	<i>S. pneumoniae</i>	Vírus	<i>S. pneumoniae</i> + vírus	Negativo	Total (%)	Odds Ratio 95% IC	<i>p</i> valor
<b>Sexo</b>							
Masculino	80	94	25	272	471 (60,31%)	0,9093 (0,4874 - 1,6964)	0,765
Feminino	61	62	18	169	310 (39,69%)	1,0997 (0,5895 - 2,0516)	0,765
Total	141	156	43	441	781 (100%)		
<b>Idade (meses)</b>							
0-12	60	88	25	206	379 (48,53%)	1,5066 (0,8082 - 2,8086)	0,1945
13-24	45	32	16	100	193 (24,71%)	1,8782 (0,9893 - 3,5657)	0,05
25-36	17	16	-	31	64 (8,19%)	0,1202 (0,0073 - 1,9755)	0,138
37-48	8	7	1	28	44 (5,63%)	0,3848 (0,0517 - 2,8634)	0,3331
49-60	5	5	1	16	27 (3,46%)	0,6520 (0,0864 - 4,9222)	0,676
>60	6	8	-	60	74 (9,48%)	0,1025 (0,0062 - 1,6826)	0,1106
Total	141	156	43	441	781 (100%)		
<b>Comorbidades</b>							
Nenhuma	112	115	37	321	585 (74,9%)	2,1381 (0,8884 - 5,1457)	0,082
Asma	18	7	-	32	57 (7,3%)	0,1362 (0,0083 - 2,2419)	0,163
Cardiopatia	5	13	3	31	52 (6,66%)	1,0546 (0,3149 - 3,5314)	0,9312
Doença neurológica	-	11	-	24	35 (4,48%)	0,2278 (0,0137 - 3,7761)	0,3018
Refluxo gastroesofágico	4	2	1	15	22 (2,82%)	0,8129 (0,1068 - 6,1904)	0,8412
Pneumopatia crônica	1	3	-	4	8 (1,02%)	0,9878 (0,0561 - 17,3976)	0,9933
Imunossupressão	-	1	-	1	2 (0,26%)	3,3862 (0,1601 - 71,6284)	0,4334
Associações	1	4	2	13	20 (2,56%)	1,9512 (0,4378 - 8,6960)	0,372
Total	141	156	43	441	781 (100%)		
<b>Destino</b>							
Retornou para casa	98	53	26	202	379 (48,53%)	1,6681 (0,8900 - 3,1262)	0,1071
Hospitalização	43	103	17	239	402 (51,47%)	0,5995 (0,3199 - 1,1236)	0,1071
Total	141	156	43	441	781 (100%)		

### 6.6 Sorotipos de *S.pneumoniae* circulantes

Durante o período estudado foram detectadas 184 amostras positivas para *S. pneumoniae*, das quais foram sorotipadas 127 (69,02%) e 57 (30,98%) cepas foram perdidas devido a descongelamento das cepas estocadas.

**Tabela 10.** Sorotipos de *S. pneumoniae* circulantes.

Sorotipo	Quantidade	(%)
6	38	29,92
NÃO TIPÁVEL	16	12,6
19A	16	12,6
14	11	8,66
19F	10	7,87
15B/15C	5	3,94
11A/11D	5	3,94
18(A/B/C)	4	3,15
23F	4	3,15
9N/9L	3	2,36
16F	2	1,57
23B	2	1,57
13	2	1,57
15A/15F	1	0,79
10A	1	0,79
4	1	0,79
8	1	0,79
7F/7A	1	0,79
20	1	0,79
34	1	0,79
17F	1	0,79
7C/7B	1	0,79
Total	127	100

Quando analisado o perfil dos sorotipos dividindo-os em dois grupos, presentes ou ausentes na VPC-10, observou-se no total a predominância dos sorotipos vacinais (69/54,33%). Apesar da queda no número de *S.pneumoniae* detectados estejam eles presentes ou não na vacina, parece haver um número crescente de cepas circulantes de *S.pneumoniae* não incluída na vacina, fato este mais evidente no ano de 2013 (Tabela 11).

**Tabela 11:** Número de sorotipos de *S. pneumoniae* circulantes nos anos estudados agrupados quanto à inclusão na VPC-10.

	<b>Sorotipos presentes na VPC-10</b>	<b>Sorotipos ausentes na VPC-10</b>	<b>Total</b>	<b><i>p</i> valor</b>
2011	35	27	62	0,6393
2012	25	15	40	0,2101
2013	9	16	25	0,0569
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>58</b>	<b>127</b>	

## 7 DISCUSSÃO

As infecções respiratórias agudas (IRAs) são importantes causas de morbidade e mortalidade em crianças jovens. Milhões de crianças ainda morrem de pneumonia no mundo, principalmente em locais onde há poucos recursos. Nos países de baixa e média renda a incidência chega a 300 casos por 1.000 crianças, o que leva a uma estimativa de seis novos episódios por semana por 1.000 crianças (CAMPBELL et al. 2013), e os casos graves com letalidade levam 1,3 milhões de crianças à morte por ano no mundo (BHUTTA, et al. 2013; NAIR, et al. 2013).

Várias podem ser a etiologia destas infecções, podendo variar desde a idade até mesmo o período do ano. *S. pneumoniae* é frequentemente associada como causa bacteriana, e os vírus respiratórios: VSR, adenovírus, influenza e parainfluenza como causa viral (WOLTER, et al. 2014; JROUNDI, et al. 2014; BANSTOLA & BANSTOLA, 2013; LAUNES, et al. 2012). Este estudo encontrou uma distribuição anual regular das pneumonias, com cada ano apresentando aproximadamente um terço do valor total dos casos. No entanto, houve picos na sua distribuição dentro de cada ano. Pôde ser observado que os maiores picos de casos de pneumonias aconteceram nos primeiros meses do ano, que coincidem com os meses de maior pluviometria no local de estudo. Este período do ano corresponde ao período de inverno em locais de clima temperado onde também já foi observado esta relação (BANSTOLA & BANSTOLA, 2013). Simonsen e colaboradores, em um estudo nos EUA em 2011 percebeu uma maior carga de hospitalizações por pneumonia durante o inverno, fato que foi atribuído em parte a pneumonia bacteriana que ocorria como uma complicação pela infecção pelo vírus influenza.

Os dados do estudo mostram picos de detecção do vírus influenza nos meses de maior pluviometria que também já foi observado em estudos anteriores como Alonso et al. 2012 que detectou predominantemente o vírus no primeiro semestre do ano com pico em meados de abril e Moura et al. 2009. O que mostra que o período de vacinação no Brasil contra o vírus influenza pode estar sendo iniciada tardiamente nesta região do país, pois quando a campanha de vacinação começa o vírus já está circulando na população infantil.

As crianças até dois anos de idade predominaram no estudo, correspondendo a aproximadamente 73,24% do total de casos, assim como outros estudos já relataram (WALKER, et al. 2013; De WALS, et al. 2008; RUCKINGER, et al. 2009) Os programas

sociais precisam se concentrar em intervenções para crianças nesta faixa etária, por exemplo, aleitamento materno de qualidade e a vacinação (WALKER, et al. 2013).

A vacinação contra alguns agentes causadores de pneumonia é uma ação preventiva que tem papel importante na redução da carga de morbidade e mortalidade, especialmente em crianças menores de cinco anos.

No Brasil há disponíveis gratuitamente no calendário de vacinação infantil duas vacinas para dois agentes frequentemente associados à pneumonia. A VPC-10 para *S pneumoniae* (responsável por pelo menos 18% dos episódios graves de pneumonias e 33% das mortes no mundo) e o vírus influenza (responsável por 7% dos episódios graves de pneumonia e 11% das mortes no mundo) (WALKER, et al. 2013).

Vários ensaios clínicos têm demonstrado a eficácia da vacina conjugada antipneumocócica em países desenvolvidos na prevenção de doença pneumocócica invasiva, relatando uma redução de 20% dos casos de pneumonia e de aproximadamente 50% do número de sorotipos, contidos na vacina, que estão presentes na nasofaringe de portadores, no entanto, estudos sobre a colonização por *S. pneumoniae* durante o uso das vacinas pneumocócicas conjugadas mostraram que, embora a colonização de sorotipos presentes na vacina foi reduzida, o nicho foi prontamente colonizado por sorotipos não vacinais, assim, o uso da vacina pneumocócica conjugada em longo prazo pode alterar a distribuição dos sorotipos da doença pneumocócica invasiva (CASHAT-CRUZ, et al. 2005; KADIOGLU, et al. 2008; PLETZ, et al. 2008; WHO, 2012).

Mesmo sem ter uma diminuição nos casos de pneumonia durante os anos estudados, nosso estudo encontrou uma redução significativa no número de detecções de pneumococos que corroboram com dados mundiais. Estudos que avaliaram o efeito da VPC-7 encontraram uma redução estatisticamente significativa na incidência total de hospitalizações por pneumonia em crianças menores de dois anos de idade logo após o primeiro ano de vacinação (De WALS, et al. 2008; RUCKINGER, et al. 2009; VESTRHEIM, et al. 2008; SIMONSEN, et al. 2011; PILISHVILI, et al. 2010). Sendo encontrada redução até mesmo nas faixas etárias não vacinadas, provavelmente através da indução de imunidade de rebanho. Estima-se que só nos EUA 13.000 mortes relacionadas à doenças pneumocócicas invasivas foram evitadas desde a introdução da VPC-7 que contém os sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F (PILISHVILI, et al. 2010).

Vale salientar que a maior eficácia da vacina pneumocócica é esperada na diminuição das doenças pneumocócicas invasivas (> 80%), em comparação com a pneumonia (geralmente <

20%) e otite média (geralmente < 10%). Já que outros potenciais patógenos podem causar a pneumonia e otite média (MEHR & WOOD, 2012).

Em relação ao Brasil, um estudo feito por Afonso e colaboradores em 2013 mostrou que durante o período pós-vacinação, as taxas de hospitalização por pneumonia diminuíram significativamente em Belo Horizonte (-40,3%), Curitiba (-37,6%), e Recife (-49,3%), e que houve pouca redução da taxa nas cidades de São Paulo (-13,4%) e Porto Alegre (-23,5%), provavelmente a menor taxa dessas últimas cidades foi devido a uma cobertura vacinal, na época, de 80%, valor inferior as três primeiras cidades que tinham mais de 90% da cobertura vacinal atingida. Chegando a conclusão que a VPC-10 reduziu as internações por pneumonia entre crianças em três das cinco cidades estudadas.

A vacina utilizada no Brasil desde 2010 é a VPC-10 que contém os sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F de *S. pneumoniae*. Observamos durante o período de estudo uma troca de predominância entre os sorotipos que compunham ou não a vacina, sorogrupos como o 6, 14 e 18 diminuíram durante o período estudado e o sorotipo 19A, sorogrupo 13 e até mesmo aqueles não tipáveis aumentaram. Este efeito já foi observado em outros países. Nos EUA as taxas de pneumonia causadas pelos sorotipos não-VPC7 aumentaram em todos os grupos etários, já a incidência de doenças pneumocócicas invasivas causadas pelo sorotipo 19A e outros tipos não-VPC7 aumentou de 0,8 para 2,7 casos por 100.000 habitantes e de 6,1 para 7,9 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (PILISHVILI, et al. 2010; HICKS, et al. 2007). Na Alemanha a incidência dos sete sorotipos incluídos na VPC7 foi consideravelmente reduzida, no entanto, o sorotipo 19A também apresentou redução (RUCKINGER, et al. 2009). Em Portugal a VPC-7 é ofertada desde 2001 no setor privado e também foi observado aumento na detecção em crianças de sorotipos não vacinais como o 19A (AGUIAR, et al. 2008). Na Espanha além do aumento nos sorotipos não-VPC7, foi observado aumento nos sorotipos 1 e 5 (MUNOZ-ALMAGRO, et al. 2008), já na Gambia, país da África Ocidental, reduziu significativamente a carga de portadores de sorotipos de pneumococos da VPC-7 em crianças não vacinadas (EGERE, et al. 2012).

O perfil dos sorotipos mais prevalentes difere de uma região para outra e a imunidade induzida aparentemente é sorotipo-específica. A VPC-7 não contém os sorotipos 1, 5, 6A, mais comuns e responsáveis por uma parcela considerável de doenças pneumocócicas invasivas em muitos países em desenvolvimento (MEHR & WOOD, 2012). Sabendo disso o SIREVA – Sistema Regional de Vacinas que compõe a rede de vigilância de *S. pneumoniae* em países da América Latina mostrou que no Brasil, de 2000 a 2005, os sorotipos mais frequentes isolados

de pacientes com pneumonia foram: sorogrupo 14 (48,5%), 1 (13,4%), 6B (7,6%), 19A (4,4%) e 5 (4,2%), para o SIREVA a VPC-10 cobre 82,4% dos sorotipos circulantes de pneumococo no Brasil responsáveis por causar pneumonias (CASTAÑEDA, et al. 2009).

Em Salvador, na Bahia, os sorotipos isolados de 70 cepas invasivas de pneumococos, sendo 77% isoladas de crianças e adolescentes com pneumonia, foram: 14 (22,9%), 5 e 6A (10% cada), 6B e 19F (8,6% cada), 9V, 18C e 23F (5,7% cada) (NASCIMENTO-CARVALHO, et al. 2003). Já em São Paulo os sorotipos mais frequentes foram 14 (36,5%), 1 (16,7%), 5 (14,6%), 6B (6,3%) e 3 (4,2%) (YOSHIKA, et al. 2011). Os dois sorogrupos mais encontrados neste estudo 6 (20,65%) e 19 (14,13%) corroboram com estudo realizado também em Fortaleza por Rey e colaboradores em 2002 com portadores assintomáticos e crianças com pneumonia onde foram os sorogrupos mais detectados com 36% para o sorogrupo 6 e 19% para o sorogrupo 19.

## 7.1 Limitações do estudo

O valor final da contribuição viral dentro das pneumonias estudadas pode ter sido subestimado, os casos que não foram detectados nenhum vírus podem representar uma parte de vírus que não foram pesquisados e que vêm sendo frequentemente relacionados com as IRAs, como é o caso dos rinovírus e coronavírus, e que são detectados por outras técnicas não empregadas na metodologia deste trabalho, como por exemplo a PCR. A técnica de imunofluorescência indireta pode também ter alterado a detecção de alguns vírus devido a sua baixa sensibilidade para alguns vírus como o adenovírus.

O material utilizado (aspirado de nasofaringe) limita-se a informar apenas uma colonização do trato respiratório superior do indivíduo por *S. pneumoniae*, sendo necessário para afirmar que esse microorganismo é o agente causador da pneumonia isolá-lo de uma amostra clínica de locais estéreis, como sangue ou lavados broncoalveolares. No entanto sabe-se que um sorotipo de pneumococo para causar uma infecção invasiva necessita colonizar o trato respiratório superior antes de conseguir invadir e disseminar-se no hospedeiro. Durante o período estudado algumas amostras das cepas de pneumococo ficaram inviabilizadas de serem reativadas após o estoque.

Vale lembrar que a técnica padrão ouro para a sorotipagem do pneumococo é a reação de Quellung, uma técnica com alto custo e de difícil acesso, que quando comparada com a técnica de PCR, apresenta algumas vantagens, pois a PCR não permite sorotipar alguns

sorogrupos de pneumococo. O período de estudos não pôde ser durante meses consecutivos, havendo apenas um único período (outubro, novembro e dezembro de 2012) em que foram cessadas as coletas, no entanto este período não afetou a observação clara do comportamento sazonal dos agentes pesquisados.

## 8 CONCLUSÕES

- Houve um pico na ocorrência de pneumonias no primeiro semestre de todos os anos estudados, tendo uma correlação positiva com os índices pluviométricos.
- O VSR foi o vírus mais frequentemente detectado.
- O vírus influenza foi o segundo mais detectado superando as detecções de parainfluenza e adenovírus, embora apenas no ano de 2013 sua detecção tenha sido significativamente aumentada em relação ao ano de 2012.
- A co-deteção entre o *S. pneumoniae* e o VSR foi a mais frequente, representando mais da metade deste tipo de co-deteção.
- Houve uma redução no percentual de detecção do *S. pneumoniae* ao longo dos anos não sendo possível observar alguma relação de sazonalidade com a estação de chuvas.
- Houve uma predominância, no total, dos sorotipos vacinais.
- Apesar da queda no número de detecções de *S. pneumoniae*, estejam eles presentes ou não na vacina, parece haver um número crescente de cepas circulantes de pneumococos não incluídos na vacina que ficou mais evidente no ano de 2013. Demonstrando uma troca de sorotipos circulantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, E.T.; MINAMISAVA, R.; BIERRENBACH, A.L.; ESCALANTE, J.J.C.; ALENCAR, A.; DOMINGUES, C.M.; MORAIS-NETO, O.L.; TOSCANO, C.M.; ANDRADE, A.L.; Effect of 10-Valent Pneumococcal Vaccine on Pneumonia among Children, Brazil. **Emerg Infect Dis**. v. 19, n. 4, p.589-97, 2013.

ALLANDER, T.; TAMMI, M.T.; ERIKSSON, M.; BJERKNER, A.; TIVELJUNG-LINDELL, A. ANDERSSON, B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** v. 102, n. 36, p. 12891-6, 2005.

ALLANDER, T. Human bocavirus. **J Clin Virol**. v.41, n.1, p. 29-33, 2008.

ALONSO, W.J.; LARANJEIRA, B.J.; PEREIRA, S.A.; FLORENCIO, C.M.; MORENO, E.C.; MILLER, M.A.; GIGLIO, R.; SCHUCK-PAIM, C.; MOURA, F.E. Comparative dynamics, morbidity and mortality burden of pediatric viral respiratory infections in an equatorial city. **Pediatr Infect Dis J**. v.31, n.1, p.9-14. 2012.

AGUIAR, S.I.; SERRANO, I.; PINTO, F.R.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M.; Changes in Streptococcus pneumoniae serotypes causing invasive disease with non-universal vaccination coverage of the seven-valent conjugate vaccine. **Clin Microbiol Infect**. v.14, n.9, p.835-43, 2008.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES. Antiviral therapy and prophylaxis for influenza in children. **Pediatrics**. v. 119, n. 4, p. 852-60, 2007.

ANDRADE, A. L.; MINAMISAVA, R.; AFONSO, E.T.; BIERRENBACH, A.L.; ROBERTA, L.; DOMINGUES, C.; MORAIS NETO, O. L.; ESCALANTE, J. J. C. Evidências preliminares de impacto da vacina Infuenza A (H1N1) e anti-pneumocócica conjugada (PCV-10) nas internações por pneumonia nos hospitais da rede do SUS – Brasil, no período de 2005 a 2010. In: Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde**. (1ªEd). Brasília: Editora MS, 2011, cap. 15. p. 311-33.

BAKER, S. C. Coronaviruses: from common colds to severe acute respiratory syndrome. **Pediatr Infect Dis J.** v. 23, n.11, p.1049-50, 2004.

BANSTOLA, A.; BANSTOLA, A. The Epidemiology of Hospitalization for Pneumonia in Children under Five in the Rural Western Region of Nepal: A Descriptive Study. **PLoS One.**v.8, n.8, p.1-5, 2013.

BERGH, M. R. V. D.; BIESBROEK, G.; ROSSEN, J. W. A.; PITERS, W. A. A. S.; BOSCH, A. A. T. M.; GILS, E. J. M. V.; WANG, X.; BOONACKER, C. W. B.; VEENHOVEN, R. H.; BRUIN, J. P.; BOGAERT, D.; SANDRES, E. A. M. Associations between Pathogens in the Upper Respiratory Tract of Young Children: Interplay between Viruses and Bacteria. **PLoS One.** v. 7, n.10, p.1-9, 2012.

BERKLEY, J.A.; MUNYWOKI, P.; NGAMA, M.; KAZUNGU, S.; ABWAO, J.; BETT, A.; LASSAUNIÉRE, R.; KRESFELDER, T.; CANE, P.A.; VENTER, M.; SCOTT, J.A.; NOKES, D.J. **JAMA.** Viral etiology of severe pneumonia among Kenyan infants and children. v. 303, n. 20, p. 2051-7, 2010.

BICER, S.; GIRAY, T. ; ÇÖL, D.; ERDAĞ, G. Ç.; VITRINEL, A.; GÜROL, Y.; ÇELİK, G.; KASPAR, Ç.; KÜÇÜK, O. Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. **Ital J Pediatr.** v.39, n. 22, 2013.

BLASER, M.J.; FALKOW, S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? **Nat Rev Microbiol.** v.7, n.12, p. 887–94, 2009.

BOSCH, A.A.T.M.; BIESBROEK, G.; TRZCINSKI, K.; SANDRES, E.A.M.; BOGAERT, D. Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. **PLoS Pathog.** v.9, n.1, e1003057, 2013.

BRASIL. Diretrizes brasileiras em pneumonia adquirida na comunidade em pediatria – 2007. **J bras pneumol.** v.33, suppl.1, p. 31-50, 2007.

BHUTTA, Z.A.; DAS, J.K.; WALKER, N.; RIZVI, A.; CAMPBELL, H.; RUDAN, I.; BLACK, R.E. Interventions to address deaths from childhood pneumonia and diarrhoea equitably: what works and at what cost? **Lancet**. v. 20, n.381, p.1417-29, 2013.

CALIX, J.J.; PORAMBO, R.J.; BRADY, A.M.; LARSON, T.R.; YOTHER, J.; ABEYGUNWARDANA, C.; NAHM, M.H. Biochemical, Genetic, and Serological Characterization of Two Capsule Subtypes among *Streptococcus pneumoniae* Serotype 20 Strains. **J biol chem**. v. 287, n. 33, p. 27885-94, 2012A.

CALIX, J.J.; DAGAN, R.; PELTON, S.I.; PORAT, N.; NAHM, M.H. Differential occurrence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 11E between asymptomatic carriage and invasive pneumococcal disease isolates reflects a unique model of pathogen microevolution. **Clin Infect Dis**. v. 54, n.6, p. 794-9, 2012B.

CAMPBELL, H.; ARIFEEN, S.; HAZIR, T.; O'KELLY, J.; BRYCE, J.; RUDAN, I.; QAZI, S.A. Measuring Coverage in MNCH: Challenges in Monitoring the Proportion of Young Children with Pneumonia Who Receive Antibiotic Treatment. **PLoS Med**. v.10, n.5, p.1-6, 2013.

CAMPS, M.; RICART, S.; DIMOVA, V.; ROVIRA, N.; MUÑOZ-ALMAGRO, C.; GARCIA, J.J.; PONS-ODENA, M.; MARCOS, M.A.; PUMAROLA, T. Prevalence of human metapneumovirus among hospitalized children younger than 1 year in Catalonia, Spain. **J Med Virol**. v. 80, n.8, p. 1452-60, 2008.

CASHAT-CRUZ, M.; MORALES-AGUIRRE, J.J.; MENDOZA-AZPIRI, M. Respiratory tract infections in children in developing countries. **Semin Pediatr Infect Dis**. v.16, n.2, p. 84-92, 2005.

CASTAÑEDA, E.; AGUDELO, C.I.; REGUEIRA, M.; CORSO, A.; BRANDILEONE, M.C.; BRANDÃO, A.P.; MALDONADO, A.; HORMAZABAL, J.C.; MARTÍNEZ, I.T.; LLANES, R.; SÁNCHEZ, J.; FERIS, J.M.; ECHANIZ-AVILES, G.; CARNALLA-BARAJAS, M.N.; TERRAZAS, M.G.; MONROY, I.H.; CHAMORRO, G.; WEILER, N.; CAMOU, T.; GABARROT, G.G.; SPADOLA, E.; PAYARES, D.; GABASTOU, J.M.; DI

FABIO, J.L.; DE LA HOZ, F. Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries: a SIREVA II project, 2000-2005. **Pediatr Infect Dis J.** v. 28, n.9, p. 265-70, 2009.

CHEN, A.Y.; CHENG, F.; LOU, S.; LUO, Y.; LIU, Z.; DELWART, E.; PINTEL, D.; QIU, J. Characterization of the gene expression profile of human bocavirus. **Virology.** v. 403, v.2, p. 145-54, 2010.

DE WALS, P.; ROBIN, E.; FORTIN, E.; THIBEAULT, R.; OUAKKI, M.; DOUVILLE-FRADET, M. Pneumonia after implementation of the pneumococcal conjugate vaccine program in the province of Quebec, Canada. **Pediatr Infect Dis J.** v. 27, n. 11, p. 963-8, 2008.

DIAS, C.A.; TEIXEIRA, L.M.; DA GLÓRIA CARVALHO, M.; BEALL, B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. **J Med Microbiol.** v. 56, n. 9, p. 1185-8, 2007.

ENDO, R.; ISHIGURO, N.; KIKUTA, H.; TERAMOTO, S.; SHIRKOOHI, R. MA, X.; EBIHARA, T.; ISHIKO, H.; ARIGA, T. Seroepidemiology of Human Bocavirus in Hokkaido Prefecture, Japan. **J Clin Microbiol.** v. 45, n. 10, p. 3218–23, 2007.

EGERE, U.; TOWNEND, J.; ROCA, A.; AKINSANYA, A.; BOJANG, A.; NSEKPONG, D.; GREENWOOD, B.; ADEGBOLA, R.A.; HILL, P.C. Indirect effect of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal carriage in newborns in rural Gambia: a randomised controlled trial. **PLoS One.** v.7, n.11, p. 1-8, 2012.

FRIAS, P. G.; SZWARCOWALD, C. L.; SOUZA JR, P. R.; ALMEIDA, W. S.; LIRA, P. I. Correcting vital information: estimating infant mortality, Brazil, 2000-2009. **ver Saude Publica.** v. 47, n.6, p. 1048-58, 2013.

GARCÍA, E.; LLULL, D.; MUÑOZ, R.; MOLLERACH, M.; LÓPEZ, R. Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*. **Res Microbiol.** v. 151, n. 6, p. 429-35, 2000.

GARDNER, P.S.; McQUILLIN, J. **Rapid virus diagnosis**: application of immunofluorescence. 2 ed. London: Butterworth, p.317, 1980.

GIRARD, M.P.; TAM, J.S.; ASSOSSOU, O.M.; KIENY, M.P. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. **Vaccine**. v. 28, n. 31, p. 4895-902, 2010.

HALL, C. B.; WEINBERG, G. A.; IWANE, M. K.; BLUMKIN, A. K.; EDWARDS, K. M.; STAAT, M. A.; AUINGER, P.; GRIFFIN, M. R.; POEHLING, K. A.; ERDMAN, D.; GRIJALVA, C. G.; ZHU, Y.; SZILAGYI, P. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. **N Engl J Med**. v. 360, n. 6, p. 588-98, 2009.

HAMENT, J.M.; AERTS, P.C.; FLEER, A.; VAN DIJK, H.; HARMSSEN, T.; KIMPEN, J.L.; WOLFS, T.F. Direct binding of respiratory syncytial virus to pneumococci: a phenomenon that enhances both pneumococcal adherence to human epithelial cells and pneumococcal invasiveness in a murine model. **Pediatr Res**. v. 58, n. 6, p. 1198–203, 2005.

HAMPP, C.; KAUF, T. L.; SAIDI, A. S.; WINTERSTEIN, A. G. Cost-effectiveness of Respiratory Syncytial Virus Prophylaxis in Various Indications. **Arch Pediatr Adolesc Med**. v. 165, n. 6, p. 498-505, 2011.

HENRICHSEN, J. The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. **J Infect**. v. 1, sup 2, p. 31–4, 1979.

HENRICHSEN, J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. **J Clin Microbiol**. v. 33, n. 10, p. 2759–62, 1995.

HENRICHSEN, J. Typing of *Streptococcus pneumoniae*: Past, Present, and Future. **Am J Med**. v.107, n.1A, p. 50S-4S, 1999.

HENRICKSON, K. J. Parainfluenza viruses. **Clin Microbiol Rev**. v. 16, n.2, p.242-64, 2003.

HILL, P.C.; CHEUNG, Y.B.; AKISANYA, A.; SANKAREH, K.; LAHAI, G.; GREENWOOD, B.M.; ADEGBOLA, R.A. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus*

pneumoniae in Gambian infants: a longitudinal study. **Clin Infect Dis.** v. 46, n. 6, p. 807-14, 2008.

HICKS, L.A.; HARRISON, L.H.; FLANNERY, B.; HADLER, J.L.; SCHAFFNER, W.; CRAIG, A.S.; JACKSON, D.; THOMAS, A.; BEALL, B.; LYNFIELD, R.; REINGOLD, A.; FARLEY, M.M.; WHITNEY, C.G. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. **J Infect Dis.** v. 196, n.9, p. 1346-54, 2007.

HOOGEN, B. G.; JONG, J. C.; GROEN, J.; KUIKEN, T.; GROOT, R.; FOUCHIER, R. A. M.; OSTERHAUS, A. D. M. E. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nat Med.** v. 7, n.6, p. 719-24, 2001.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy: 2013 Release.** Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 30 abril 2014.

IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. **Objetivos de Desenvolvimento do Milênio: Relatório Nacional de Acompanhamento.** Brasília-DF. 2014. 208 p.

ISHIZUKA, S.; YAMAYA, M.; SUZUKI, T.; TAKAHASHI, H. IDA, S.; SASAKI, T.; INOUE, D.; SEKIZAWA, K.; NISHIMURA, H.; SASAKI, H. Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. **J Infect Dis.** v. 188, n. 12, p. 1928-39, 2003.

IWANE, M.K.; EDWARDS, K.M.; SZILAGYI, P.G.; WALKER, F.J.; GRIFFIN, M.R.; WEINBERG, G.A.; COULEN, C.; POEHLING, K.A.; SHONE, L.P.; BALTER, S.; HALL, C.B.; ERDMAN, D.D.; WOOTEN, K.; SCHWARTZ, B. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. **Pediatrics.** v. 113, n. 6, p. 1758-64, 2004.

JARTTI, T.; JARTTI, L.; PELTOLA, V.; WARIS, M.; RUUSKANEN, O. Identification of respiratory viruses in asymptomatic subjects: asymptomatic respiratory viral infections. **Pediatr Infect Dis J.** v. 27, n. 12, p. 1103-7, 2008.

JARTTI, T.; HEDMAN, K.; JARTTI, L.; RUUSKANEN, O.; ALLANDER, T.; SÖDERLUND-VENERMO, M. Human bocavirus-the first 5 years. **Rev Med Virol.** v. 22, n.1, p. 46-64, 2012.

JIN, P.; KONG, F.; XIAO, M.; OFTADEH, S.; ZHOU, F.; LIU, C.; RUSSELL, F.; GILBERT, G.L. First report of putative *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D among nasopharyngeal isolates from Fijian children. **J Infect Dis.** v. 200, n.9, p. 1375-80, 2009.

JONES II, M.S.; HARRACH, B.;GANAC, R.D.; GOZUM, M.M.A.; CRUZ. W.P.; RIEDEL, B.; PAN, C.; DELWART, E.L.; SCHNURR, D.P. New Adenovirus Species Foun in a Patient Presenting with Gastroenteritis. **J Virol.** v. 81, n.11, p. 5978-84, 2007.

JROUNDI, I.; MAHRAOUI, C.; BENMESSAOUD, R.; MORALEDA, C.; TLIGUI, H.; SEFFAR, M.; KETTANI, S.C.; BENJELLOUN, B.S.; CHAACHO, S.; MAAROUFI, A.; HAYES, E.B.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, M.J.; MUÑOZ-ALMAGRO, C.; RUIZ, J.; ALONSO, P.L.; BASSAT, Q. The epidemiology and aetiology of infections in children admitted with clinical severe pneumonia to a university hospital in Rabat, Morocco. **J Trop Pediatr.** v. 60, n.4, p. 270-8, 2014.

KADIOGLU, A.; WEISER, J.N.; PATON, J.C.; ANDREW, P.W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat Rev Microbiol.** v. 6, n. 4, p. 288-301, 2008.

KAHN, J.S. Epidemiology of Human Metapneumovirus. **Clin Microbiol Rev.** v. 19, n. 3, p. 546–57, 2006.

KAHN, J.S.; KESEBIR, D.; COTMORE, S.F.; D'ABRAMO, A. JR.; COSBY, C.; WEIBEL, C.; TATTERSALL, P. Seroepidemiology of human bocavirus defined using recombinant virus-like particles. **J Infect Dis.** v. 198, n.1, p. 41-50, 2008.

KONEMAN, E.W.; ALLEN. S.D.; JANDA, W.M.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER P.C.; Jr. WINN, W.C.; WOODS, G. *Cocos Gram-Positivos: Parte II: Estreptococos,*

Enterococos e Bactérias “Semelhantes a Estreptococo”. In: KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER P.C.; Jr. WINN, W.C.; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Guanabara Koogan. 6ª Ed. Cap. 13, p. 666-758, 2008.

KUSEL, M.M.; KLERK, N.H.; HOLT, P.G.; KEBADZE, T.; JOHNSTON, S.L.; SLY, P.D. Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study. **Pediatr Infect Dis J.** v. 25, n.8, p. 680-6, 2006.

LAUNES, C.; DE-SEVILLA, M.F.; SELVA, L.; GARCIA-GARCIA, J.J.; PALLARES, R.; MUÑOZ-ALMAGRO, C. Viral coinfection in children less than five years old with invasive pneumococcal disease. **Pediatr Infect Dis J.** v. 31, n. 6, p. 650-3, 2012.

LEVINE, O. S.; O'BRIEN, K. L.; DELORIA-KNOLL, M.; MURDOCH, D.R.; FEIKIN, D. R.; DELUCA, A. N.; DRISCOLL, A. J.; BAGGETT, H. C.; BROOKS, W. A.; HOWIE, S. R. C.; KOTLOFF, K. L.; MADHI, S. A.; MALONEY, S. A.; SOW, S.; THEA, D. M.; SCOTT, J. A. The Pneumonia Etiology Research for Child Health Project: A 21st Century Childhood Pneumonia Etiology Study. **Clin Infect Dis.** v. 54, Suppl 2, p.93–101, 2012.

LIU, W.K.; LIU, Q.; CHEN, D.H.; LIANG, H.X.; CHEN, X.K.; HUANG, W.B.; QIN, S.; YANG, Z.F.; ZHOU, R. Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. **BMC Infect Dis.** v. 13, n. 28, p. 1-8, 2013.

LOUIE, J.K.; ROY-BURMAN, A.; GUARDIA-LABAR, L.; BOSTON, E.J.; KIANG, D.; PADILLA, T.; YAGI, S.; MESSENGER, S.; PETRU, A.M.; GLASER, C.A.; SCHNURR, D.P. Rhinovirus associated with severe lower respiratory tract infections in children. **Pediatr Infect Dis J.** v. 28, n. 4, p. 37-9, 2009.

LYNCH, J.P.; ZHANEL, G.G.; Streptococcus pneumoniae: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. **Curr Opin Pulm Med.** v. 16, n.3, p. 217-25, 2010.

MACKAY, I.M. Human rhinoviruses: the cold wars resume. **J Clin Virol.** v. 42, n.4, p.297-320, 2008.

MANDELBOIM, M.; DROR, P.; AZAR, R.; BROMBERG, M.; MENDELSON, E. Adenovirus infections in hospitalized patients in Israel: epidemiology and molecular characterization. **J Clin Microbiol.** v. 49, n.2, p. 597-601, 2011.

MCCULLERS, J. A. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. **Clin Microbiol Rev.** v. 19, p. 571-82, 2006.

MEHR, S.; WOOD, N. Streptococcus pneumoniae--a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. **Paediatr Respir Rev.** v. 13, n.4, p. 258-64, 2012.

MINA, M. J.; McCULLERS, J. A.; KLUGMAN, K. P. Live Attenuated Influenza Vaccine Enhances Colonization of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus in Mice. **mBio.** v. 5, n. 1, p. 1-10, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança.** Brasília-DF. 2010A. 18p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Pacto pela Redução da Mortalidade Infantil no Nordeste e Amazônia Legal 2009 – 2010.** Brasília-DF. 2010B. 184 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo de Tratamento de Influenza 2013.** Brasília-DF. 2013. 20 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe Técnico: Campanha Nacional de Vacinação Contra a Influenza.** Brasília-DF. 2014. 35 p.

MORETTI, J.R.F.; PEREIRA, J.L.; SAKAE, T.M.; SILVA, R.M. Vacina pneumocócica: histórico, indicações clássicas e efeitos indiretos. **Pulmão RJ.** v. 16, n.2-4, p. 91-6, 2007.

MOSCONA, A. Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. **J Clin Invest.** v. 115, n.7, p. 1688-98, 2005.

MOURA, F.E.; PERDIGÃO, A.C.; SIQUEIRA, M.M. Seasonality of influenza in the tropics: a distinct pattern in northeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v. 81, n.1, p. 180-3, 2009.

MUÑOZ-ALMAGRO, C.; JORDAN, I.; GENE, A.; LATORRE, C.; GARCIA-GARCIA, .JJ.; PALLARES, R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. **Clin Infect Dis.** v.46, n.2, p. 174-82, 2008.

MUNKSGAARD, B. Adenovirus. **Am J Transplant.** v. 4, suppl.10, p.101-4, 2004.

NAIR, H.; NOKES, D.J.; GESSNER, B.D.; DHERANI, M.; MADHI, S.A.; SINGLETON, R.J.; O'BRIEN, K.L.; ROCA, A.; WRIGHT, P.F.; BRUCE, N.; CHANDRAN, A.; THEODORATOU, E.; SUTANTO, A.; SEDYANINGSIH, E.R.; NGAMA, M.; MUNYWOKI, P.K.; KARTASASMITA, C.; SIMÕES, E.A.; RUDAN, I.; WEBER, M.W.; CAMPBELL, H.; Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in Young children: a systematic review and meta-analysis. **Lancet.** v. 375, n. 9725 , p. 1545-55, 2010.

NAIR, H.; SIMÕES, E. A. F.; RUDAN, I.; GESSNER, D. B.; AZZIZ-BAUMGARTNER, E.; ZHANG, J. S. Z.; FEIKIN, D. R.; MACKENZIE, G. A.; MOÏSI, J. C.; ROCA, A.; BAGGETT, H. C.; ZAMAN, S. M. A.; SINGLETON, R. J.; LUCERO, CHANDRAN, A.; GENTILE, A.; COHEN, C.; KRISHNAN, A.; BHUTTA, Z. A.; ARGUEDAS, A.; CLARA, A. W.; ANDRADE, A. L.; OPE, M.; RUVINSKY, R. O.; HORTAL, M.; MCCracken, J. P.; MADHI, S. A.; BRUCE, N.; QAZI, S. A.; MORRIS, S. S.; ARIFEEN, S. E. L.; WEBER, M. W.; SCOTT, J. A. G.; BROOKS, W. A.; BREIMAN, R. F.; CAMPBELL, H. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. **The Lancet.** v.381, n. 9875, p. 1380 - 1390, 2013.

NASCIMENTO-CARVALHO, C. M.; FREITAS-SOUZA, L. S.; MORENO-CARVALHO, O. A.; ALVES, N. N.; CALDAS, R. M.; BARBERINO, M. G.; DUARTE, J.; BRANDÃO, M. A.; MENDONÇA, D. R.; SILVA, A.; GUERRA, M. L.; BRANDILEONE, M. C.; DI

FABIO, J. L. Invasive pneumococcal strains isolated from children and adolescents in Salvador. **J. Pediatr. (Rio J.)** v.79, n.3, p. 209-14, 2003.

NOLTE, F.S. Molecular diagnostics for detection of bacterial and viral pathogens in community-acquired pneumonia. **Clin Infect Dis.** v.1, n.47, Suppl 3, p. 123-6, 2008.

PAI, R.; GERTZ, R.E.; BEALL, B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. **J Clin Microbiol**, v.44, n.1, p.124-31, 2006.

PARK, I.H.; PRITCHARD, D.G.; CARTEE, R.; BRANDAO, A.; BRANDILEONE, M.C.; NAHM, M.H. Discovery of a new capsular serotype (6C) with in serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. **J Clin Microbiol.** v. 45, p. 1225-3, 2007.

PILISHVILI, T.; LEXAU, C.; FARLEY, M.M.; HADLER, J.; HARRISON, L.H.; BENNETT, N.M.; REINGOLD, A.; THOMAS, A.; SCHAFFNER, W.; CRAIG, A.S.; SMITH, P.J.; BEALL, B.W.; WHITNEY, C.G.; MOORE, M.R. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. **J Infect Dis.** v. 201, n.1, . p.32-41, 2010.

PLETZ, M.W.; MAUS, U.; KRUG, N.; WELTE, T.; LODE, H. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. **Int J Antimicrob Agents.** v. 32, n.3, p. 199-206, 2008.

REY, L.C.; WOLF, B.; MOREIRA, J.L.; MILATOVIC, D.; VERHOEF, J.; FARHAT, C.K. Antimicrobial susceptibility and serotypes of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* in children with pneumonia and in children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. **Int J Antimicrob Agents.** v. 20, n.2, p. 86-92, 2002.

RUCKINGER, S.; VAN DER LINDEN, M.; REINERT, R.R.; VON KRIES, R.; BURCKHARDT, F.; SIEDLER, A. Reduction in the incidence of invasive pneumococcal disease after general vaccination with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in Germany. **Vaccine.** v. 27, n. 31, p. 4136-41, 2009.

RUDAN, I.; BOSCHI-PINTO, C.; BILOGLAV, Z.; MULHOLLAND, K.; CAMPBELL, H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. **Bull World Health Organ.** v. 86; n. 5, p. 408-16, 2008.

RUDAN, I.; O'BRIEN, K.L.; NAIR, H.; LIU, L.; THEODORATOU, E.; QAZI, S.; LUKSIC, I.; FISCHER WALKER, C.L.; BLACK, R.E.; CAMPBELL, H.; Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. **J Glob Health.** v.3, n. 1, p.1-14, 2013.

RUUSKANEN, O.; LAHTI, E.; JENNINGS, L.C.; MURDOCH, D.R. Viral pneumonia. *The Lancet.* v. 377, n. 9773, p. 1264-75, 2011. SONG, J.Y.; EUN, W.B.; NAHM, M.H. Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia: Current Pitfalls and the Way Forward. **Infect Chemother.** v. 45, n. 4, p. 351–66, 2013.

SHAW, C. A.; CIARLET, M.; COOPER, B. W.; DIONIGI, L.; KEITH, P.; O'BRIEN, K. B.; RAFIE-KOLPIN, M.; DORMITZER, P. R. The path to an RSV vaccine. **Curr Opin Virol.** v. 3, n. 3, p.332-42, 2013.

SIMONSEN, L.; TAYLOR, R.J.; YOUNG-XU, Y.; HABER, M.; MAY, L.; KLUGMAN, K.P. Impact of pneumococcal conjugate vaccination of infants on pneumonia and influenza hospitalization and mortality in all age groups in the United States. **MBio.** v. 2, n. 1, p. 1-10, 2011.

SONG, J. Y.; EUN, B. W.; NAHM, M. H. Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia: Current Pitfalls and the Way Forward. **Infect Chemother.** v. 45, n.4, p. 351–66, 2013A.

SONG, J.Y.; NAHM, M.H.; MOSELEY, M.A. Clinical Implications of Pneumococcal Serotypes: Invasive Disease Potential, Clinical Presentations, and Antibiotic Resistance. **J Korean Med Sci.** v. 28, n.1, p. 4-15, 2013B.

TAUBENBERGER, J.K.; MORENS, D.M. The pathology of influenza virus infections. **Annu Rev Pathol.** v. 3, p. 499-522, 2008.

TELLIER, R. Review of aerosol transmission of influenza A virus. **Emerg Infect Dis.** v. 12, n. 11, p. 1657-62, 2006.

THORBURN, K.; HARIGOPAL, S.; REDDY, V.; TAYLOR, N.; VAN SAENE, H.K. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. **Thorax.** v. 61, n. 7, p. 611–5, 2006.

VAN DER HOEK, L.; IHORST, G.; SURE, K.; VABRET, A.; DIJKMAN, R.; DE VRIES, M.; FORSTER, J.; BERKHOUT, B.; UBERLA, K. Burden of disease due to human coronavirus NL63 infections and periodicity of infection. **J Clin Virol.** v. 48, n.2, p.104-8, 2010.

VERANI, J. R.; MCCRACKEN, J.; ARVELO, W.; ESTEVEZ, A.; LOPEZ, M. R.; REYES, R.; MOIR, J. C.; BERNART, C.; MOSCOSO, F.; GRAY, J.; OLSEN, S. J.; LINDBLADE, K. A. Surveillance for Hospitalized Acute Respiratory Infection in Guatemala. **PLoS One.** v.8, n.12, 2013.

VESTRHEIM, D.F.; LOVOLL, O.; AABERGE, I.S.; CAUGANT, D.A.; HOIBY, E.A.; BAKKE, H.; BERGSAKER, M.R. Effectiveness of a 2+1 dose schedule pneumococcal conjugate vaccination programme on invasive pneumococcal disease among children in Norway. **Vaccine.** v. 26, n. 26, p. 3277-81, 2008.

VICTORA, C. G.; AQUINO, E. M.; DO CARMO LEAL, M.; MONTEIRO, C. A.; BARROS, F. C.; SZWARCOWALD, C. L. Maternal and child health in Brazil: progress and challenges. **Lancet.** v. 377. p. 1863-76, 2011.

WALKER, C.L.; RUDAN, I.; LIU, L.; NAIR, H.; THEODORATOU, E.; BHUTTA, Z.A.; O'BRIEN, K.L.; CAMPBELL, H.; BLACK, R.E. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **Lancet.** v. 381, n. 9875, p. 1405-16, 2013.

WALSH, M. P.; SETO, J.; JONES, M. S.; CHODOSH, J.; XU, W.; SETO, D. Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen. **J Clin Microbiol.** v. 48, n. 3, p. 991-3, 2010.

WHO (World Health Organization). Pneumococcal vaccines WHO position paper -2012 – Recommendations. **Vaccine.** v. 30, p. 4717–8, 2012.

WOLTER, N.; TEMPIA, S.; COHEN, C.; MADHI, S.A.; VENTER, M.; MOYES, J.; WALAZA, S.; MALOPE-KGOKONG, B.; GROOME, M.; DU PLESSIS, M.; MAGOMANI, V.; PRETORIUS, M.; HELLFERSCEE, O.; DAWOOD, H.; KAHN, K.; VARIAVA, E.; KLUGMAN, K.P.; VON GOTTFBERG, A. High nasopharyngeal pneumococcal density, increased by viral coinfection, is associated with invasive pneumococcal pneumonia. **J Infect Dis.** v. 210, n. 10, p.1649-57, 2014.

YOSHIOKA, C.R.; MARTINEZ, M.B.; BRANDILEONE, M.C.; RAGAZZI, S.B.; GUERRA, M. L.; SANTOS, S.R.; SHIEH, H.H.; GILIO, A.E. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. **J Pediatr (Rio J).** v. 87, n. 1, p. 70-5, 2011.

ZAKI, A. M.; VAN BOHEEMEN, S.; BESTEBROER, T. M.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **N Engl J Med.** v. 367, n.19, p. 1814-20, 2012.

**APÊNDICE A**  
**INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS**

Ficha nº \_\_\_\_\_

Projeto de Pesquisa: **Inclusão das crianças na faixa etária de seis meses a dois anos nas campanhas de vacinação de influenza: impacto dessa estratégia nas taxas de morbidade e mortalidade infantil.**

Responsável pela coleta: \_\_\_\_\_ Médico \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_\_\_

**Dados pessoais do paciente**

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) Masc ( ) Fem  
Data de nascimento: \_\_\_\_\_ Idade em meses: \_\_\_\_\_  
Bairro: \_\_\_\_\_ Procedência: ( ) Fortaleza ( ) Outra (citar): \_\_\_\_\_  
Pessoa p/ contato: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
( ) Emergência ( ) Observação ( ) Ambulatório/Consultório ( ) Enfermaria: Leito \_\_\_\_\_ Prontuário \_\_\_\_\_

**Histórico do paciente**

( ) Não mamou ( ) Mamou < 6 m ( ) Mamou ≥ 6 m ( ) Ainda mama

Vacinação para influenza no ano de 2011 ou 2012: ( ) Sim ( ) Não / Pneumococo: ( ) Sim ( ) Não

Absenteísmo escolar: ( ) Não ( ) Sim, nº de dias: \_\_\_\_\_

Absenteísmo ao trabalho pela doença atual da criança? ( ) Não ( ) Sim, nº de dias: \_\_\_\_\_

Fator de risco: ( ) Não ( ) Prematuridade ( ) Cardiopatia ( ) Pneumopatia congênita ou crônica

( ) Doença neurológica ( ) Imunossupressão ( ) Asma ( ) Doença do refluxo gastroesofágico

( ) Fumante em casa ( ) Bebê chador ( ) Outros: \_\_\_\_\_

Familiar com IRA em casa: ( ) Não ( ) Sim, identificar: \_\_\_\_\_

( ) O paciente nunca cansou Idade em que cansou pela 1ª vez: \_\_\_\_\_

História de cansaço na família: ( ) Não ( ) Pai ( ) Mãe ( ) Irmão(s) ( ) Tio(s) ( ) Avó(s)

**Doença atual:** Queixa principal: \_\_\_\_\_ Tempo de início de sintomas: \_\_\_\_\_

( ) Coriza ( ) Obstrução nasal ( ) Espirros ( ) Tosse cheia ( ) Febre ( ) Anorexia ( ) Vômitos ( ) Diarreia

( ) Cansaço ( ) Exantema ( ) Conjuntivite ( ) Convulsões ( ) Cianose ( ) BAN

Outros: \_\_\_\_\_

**Exame físico:** Peso: \_\_\_\_\_ Temp: \_\_\_\_\_ Freq resp: \_\_\_\_\_

Estado geral: ( ) Bom ( ) Gemente ( ) Cianótico

Orofaringe: ( ) Não examinada ( ) Normal ( ) Hiperemiada ( ) Hipertrofia de amígdalas ( ) Pontos purulentos ( ) Vesículas ( ) Úlceras

Presença de tiragem: ( ) Não ( ) Intercostal ( ) Supraclavicular ( ) Subdiafragmática

Ausculta pulmonar: ( ) Não realizada ( ) Normal ( ) Sibilos ( ) Roncos ( ) Estertores ( ) Estridor

Raio-X de tórax: ( ) Não solicitado ( ) Normal ( ) Condensação ( ) Infiltrado intersticial

( ) Hiperinsuflação pulmonar ( ) Outros: \_\_\_\_\_

**Hipótese diagnóstica da doença atual:** \_\_\_\_\_

**Tratamento instituído pelo médico**

Paciente fez uso de medicação no hospital durante o atendimento: ( ) Não ( ) Sim

( ) Antitérmico ( ) Aerossol ( ) Salbutamol ( ) Corticoide ( ) Adrenalina

( ) Outros: \_\_\_\_\_

Medicação prescrita para casa: ( ) Não ( ) Sim

( ) Antitérmico ( ) Aerossol ( ) Corticoide ( ) Antibiótico

( ) Outra: \_\_\_\_\_

Destino do paciente: ( ) Retornou p/ casa ( ) Internamento no HIAS ( ) Encaminhamento para outro hospital, identificar o hospital: \_\_\_\_\_ ( ) Óbito

**Observações:** \_\_\_\_\_

---

**APÊNDICE B**  
**TERMO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Estudo: Vacinação de crianças de mais de seis meses a dois anos nas campanhas de vacinação contra influenza: impacto dessa ação na saúde de crianças de Fortaleza

Seu filho (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa com a finalidade de conhecer o impacto das infecções hospitalares respiratórias virais em crianças hospitalizadas. Estas infecções causam um aumento na permanência hospitalar e podem complicar o estado de saúde da criança. A participação do seu filho é muito importante para nós. Este documento contém informações sobre como estaremos realizando nosso trabalho, leia-o atentamente e qualquer dúvida teremos o prazer de esclarecê-las.

Eu, \_\_\_\_\_  
portador do RG: \_\_\_\_\_ e do CPF \_\_\_\_\_ nascido  
em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ concordo livre e espontaneamente que meu filho  
\_\_\_\_\_ nascido em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

participe do estudo “Vacinação de crianças de mais de seis meses a dois anos nas campanhas de vacinação contra influenza: impacto dessa ação na saúde de crianças de Fortaleza”.

Declaro que obtive as informações necessárias acerca deste estudo e que as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente de que:

- I) Este estudo tem por objetivo avaliar a frequência das infecções respiratórias agudas hospitalares causadas por vírus em crianças hospitalizadas;
- II) Será realizada a coleta de secreção nasal através de aspiração com uma sonda. Esse procedimento é indolor, mas pode causar incômodo, fazendo com que pacientes de pouca idade como as crianças chorem. Dificilmente um pequeno sangramento na mucosa nasal pode ocorrer, mas é facilmente controlado pelo uso de um tampão de algodão;
- III) A participação do meu filho (a) neste estudo não é para fins terapêuticos e não terá nenhum custo para mim;
- IV) Tenho a liberdade de desistir a qualquer momento sem a necessidade de dar explicação;
- V) A minha desistência não acarreta nenhum prejuízo ou interferência no atendimento ou no tratamento do meu filho.
- VI) Os resultados serão sigilosos, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas desde que a identidade do meu filho não seja revelada;
- VII) Caso deseje poderei saber os resultados do estudo. Obs: marque com um X;  
(    ) sim, desejo conhecer os resultados;

( ) não desejo conhecer os resultados.

Fortaleza \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

Responsável: \_\_\_\_\_

Testemunha 1 : \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

Médico Responsável: \_\_\_\_\_

Prof. Responsável pelo Projeto: \_\_\_\_\_

Dra Fernanda Edna Araújo Moura

## ANEXO A



### HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Tertuliano Sales 544 – Vila União – Fortaleza – Ceará

FoneFax: (85) 3101.4212 – 3101.4283

Fortaleza, 17 de dezembro de 2009.

**Registro no CEP:** 070/09

**Data da Aprovação:** 17/12/2009

**Título do Projeto:** "Pneumonias adquiridas na comunidade de etiologia viral em crianças atendidas por doença respiratória aguda no Hospital Infantil Albert Sabin: prevalência, apresentações clínicas e complicações"

**Pesquisadora Responsável:** Fernanda Edna Araújo Moura

**Instituição / Serviço:** Universidade Federal do Ceará

Levamos ao conhecimento de V. S<sup>a</sup>, que o Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do Hospital Infantil Albert Sabin – Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, aprovou o projeto supracitado.

O pesquisador deverá apresentar uma cópia do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Regina Lúcia Ribeiro Moreno  
Coord<sup>a</sup>. do Comitê de Ética em Pesquisa

## ANEXO B



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS

Rua Tertuliano Sales, 544 – Vila União  
60410-790 – Fortaleza/Ce – Fone/Fax (85) 3101.4212 - Email: cep@hias.ce.gov.br

Fortaleza, 12 de junho de 2013

**Registro no CEP HIAS:** 024/2013

**Data da Aprovação:** 12/06/2013

**Título do Projeto:** "Inclusão das crianças na faixa etária de seis meses a dois anos nas campanhas da vacinação de influenza: impacto dessa ação na saúde de crianças de Fortaleza"

**Título Público da Pesquisa:** "Vacinação de crianças de mais de 6 meses a 2 anos de idade contra influenza: impacto dessa ação preventiva"

**CAAE:** 12248713.5.0000.5054

**Pesquisadora Responsável:** Fernanda Edna Araújo Moura

**Instituições:** UFC e HIAS

Levamos ao conhecimento de V. S<sup>a</sup>, que o Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do Hospital Infantil Albert Sabin – Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, acatou o parecer de aprovação Nº 262.143 do projeto supracitado emitido pelos CEP da Universidade Federal do Ceará - UFC (PROSPEQ).

A pesquisadora deverá apresentar uma cópia do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Regina Lúcia-Ribeiro Moreno  
Coord<sup>a</sup>. do Comitê de Ética em Pesquisa