



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

SABRYNNA BRITO OLIVEIRA

**VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO EM PNEUMONIAS ADQUIRIDAS
NA COMUNIDADE EM DOIS ANOS CONSECUTIVOS DE VIGILÂNCIA (2010 E
2011) EM UM HOSPITAL INFANTIL DE FORTALEZA.**

FORTALEZA

2014

SABRYNNA BRITO OLIVEIRA

**VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO EM PNEUMONIAS ADQUIRIDAS
NA COMUNIDADE EM DOIS ANOS CONSECUTIVOS DE VIGILÂNCIA (2010 E
2011) EM UM HOSPITAL INFANTIL DE FORTALEZA.**

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^ª. Dr^ª. Fernanda Edna Araújo 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)

- O51v Oliveira, Sabryna Brito.
VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO EM PNEUMONIAS ADQUIRIDAS NA
COMUNIDADE EM DOIS ANOS CONSECUTIVOS DE VIGILÂNCIA (2010 E 2011) EM UM
HOSPITAL INFANTIL DE FORTALEZA. / Sabryna Brito Oliveira. – 2014.
66 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 Araújo Moura.

1. Pneumonia. 2. Vírus Sincicial Respiratório. 3. Imunofluorescência. 4. RT-PCR. I. Título.

CDD 616.9

SABRYNNA BRITO OLIVEIRA

**VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO EM PNEUMONIAS ADQUIRIDAS
NA COMUNIDADE EM DOIS ANOS CONSECUTIVOS DE VIGILÂNCIA (2010 E
2011) EM UM HOSPITAL INFANTIL DE FORTALEZA.**

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: 17/01/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fernanda Edna Araújo Moura (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Cibele Barreto Mano de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

À FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Edna Araújo Moura, orientadora, pela oportunidade.

Aos professores doutoresparticipantes da banca examinadora Cibele Barreto Mano de Carvalho e Marcos Fábio Gadelha Rocha pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Prof^a Dr^a Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante pela dedicação, zelo e empenho com Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica na condição de coordenadora; além da solidariedade e acolhimento no decorrer do meu mestrado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica por transmitirem um pouco do seu conhecimento no decorrer das disciplinas. Aos demais funcionários responsáveis pelo funcionamento deste PPG.

Aos colegas do mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas no decorrer das disciplinas e experimentos. Aos alunos do CEMM – Centro de Ensino em Micologia Médica (UFC), pela calorosa acolhida, em especial à Rosana – uma pessoa trilegal!

Aos amigos Francisco Eliclécio Rodrigues da Silva, Morgana Maria Oliveira Barboza, Hassã Pereira Lemos e Leandro Lima, pessoas excepcionais que levarei comigo por toda a vida. Aos demais alunos do Laboratório de Virologia da UFC pelas

A todos os profissionais do Hospital Infantil Albert Sabin por colaborarem com a pesquisa, em especial à Autagrácia Quixadá Lima, chefe do Serviço de Arquivamento Médico Estatístico – SAME.

Aos amigos e colegas que me acompanham desde a graduação por continuarem na torcida. Vocês são fundamentais na minha caminhada. Dentre esses amigos, preciso destacar Mara Dayanne e Bárbara Santos pela amizade atemporal, Kélvio Silva pelo companheirismo e incentivo e Thiago e Diego pelas boas histórias! Não posso deixar de mencionar também a Prof^a Dr^a Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira, a quem hoje tenho o prazer de chamar apenas de Lina, pelo direcionamento, amizade e acalento que transcenderam a distância.

À família Sousa Costa, na pessoa de Francisco das Chagas e Joana D’Arc, pela acolhida em Fortaleza.

E por último, mas não menos fundamental, à d. Rose, mãe-amiga, pelas orações poderosas e à minha família pela torcida e apoio.

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (VSRh) é o principal agente viral causador de infecções respiratórias agudas do trato respiratório inferior em crianças de até cinco anos de idade. A exemplo dessas infecções pode-se citar a Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC) que representa uma das principais causas de óbito entre as doenças infecciosas nessa faixa etária. Os objetivos desse estudo foram verificar o percentual de detecção de VSRh em casos de PAC na cidade de Fortaleza, Ceará – Brasil, nos anos de 2010 e 2011 através das técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) e da reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa do RNA viral (RT-PCR), além de verificar se há diferença significativa na epidemiologia e sazonalidade do VSRh quando comparados os resultados entre as técnicas utilizadas. Das 483 amostras de PAC, 195 (40.37%) foram diagnosticadas em 2010 e 288 (59.63%) em 2011. Do total, 55 amostras (11.38%) foram positivas para VSRh pela técnica de IFI e 97 (20.08%) pela técnica de RT-PCR. Houve um aumento significativo de 43.29% no total de amostras positivas para VSRh por RT-PCR, quando comparado com a técnica de IFI ($p=0,0000$). A RT-PCR apresentou sensibilidade, especificidade, concordância e valor preditivo positivo e negativo de 94.54%, 89.48%, 62.82%, 53.60% e 99.22% respectivamente. Observou-se que VSRh não seguiu o mesmo padrão sazonal quando comparados os anos de 2010 e 2011. Os casos positivos de 2011 aconteceram principalmente nos meses de março e abril, três meses antes dos casos positivos de 2010, que ocorreram nos meses de maio, junho, julho e agosto ($p=0,0000$). Observou-se que o pico de positividade esteve correlacionado com o período chuvoso, mas não necessariamente com todos os picos de chuvas do ano correspondente e ainda que a positividade entre as duas técnicas apresentou picos em meses distintos. A ocorrência do VSRh na cidade de Fortaleza mostrou um padrão sazonal associado ao período chuvoso por ambas as técnicas. A técnica de RT-PCR mostrou-se mais sensível na detecção de casos de PAC por VSRh quando comparada à IFI, possibilitando uma melhor identificação do agente viral e permitindo uma melhor caracterização da extensão dos períodos epidêmicos do vírus.

Palavras-chave: Pneumonia, Vírus Sincicial Respiratório, Imunofluorescência, RT-PCR

ABSTRACT

The Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is the leading cause of acute respiratory infection, lower respiratory tract infections in children under five years old viral agent. The example of these infections can quote the Community Acquired Pneumonia (CAP) is the leading cause of death among infectious diseases in this age group. Correct identification of the causative agent of CAP is important for the institution of correct treatment, thus avoiding the misuse of antibiotics and preventing hospital infections. The objectives of this study were to assess the percentage of detection of HRSV in cases of CAP in the city of Fortaleza, Ceará - Brazil, in the years 2010 and 2011 through the immunofluorescence assay (IFA) and polymerase chain reaction preceded transcription reverse viral RNA (RT-PCR), and check for significant differences in the epidemiology and seasonality of HRSV compared the results between techniques. Of the 483 samples of CAP, 195 (40.37 %) were diagnosed in 2010 and 288 (59.63 %) in 2011. Of the total, 55 samples (11:38 %) were positive for HRSV by IFA technique and 97 (20.8%) by RT - PCR. A significant increase of 43.29 % in total samples positive for HRSV by RT-PCR when compared to the IFA technique ($p = 0.0000$). RT - PCR showed a sensitivity, specificity, agreement and positive and negative predictive value of 94.54 %, 89.48 %, 62.82 %, 53.60 % and 99.22 % respectively. It was observed that HRSV did not follow the same seasonal pattern when comparing the years 2010 and 2011. Positive cases 2011 occurred mainly in the months of March and April , three months before the 2010 positive cases , which occurred in the months of May, June , July and August ($p = 0.0000$). It was observed that the peak positive was correlated with the rainy season, but not necessarily all peaks of rainfall of the year in which the positive and even between both techniques showed peaks at different months. The occurrence of HRSV in Fortaleza showed a seasonal pattern associated with the rainy season for both techniques. The RT -PCR was more sensitive in detecting cases of CAP caused by HRSV compared to the IFI , enabling better identification of the viral agent and allowing a better characterization of the extent of the epidemic virus periods.

Keywords: Pneumonia, Human Respiratory Syncytial Virus, immunofluorescence, RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência mundial dos casos de PAC em crianças menores de 5 anos.....	15
Figura 2 - Estrutura do VSRh	17
Figura 3 - Representação esquemática do genoma do VSRh	17
Figura 4 - Distribuição mensal do volume de chuvas casos de pneumonias totais e positivas para VSRh nos anos de 2010 e 2011.....	47
Figura 5- Distribuição semanal dos casos de pneumonias positivas para o VSRh por IFI e RT-PCR nos anos de 2010 e 2011.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da população de estudo positiva e negativa para o VSRh nos anos de 2010 e 2011.....	43
Tabela 2 - Comorbidades relacionadas a pacientes apresentando pneumonias VSRh (+) e VSRh (-) nos anos de estudo.....	44
Tabela 3 - Presença ou ausência de fatores de risco apresentados por pacientes com pneumonias VSRh (+) e VSRh (-) nos anos de estudo.....	45
Tabela 4 - Comparação dos resultados positivos e negativos para VSRh entre os métodos IFI e RT-PCR.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	DNA complementar
FUNCEME	Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos
HIAS	Hospital Infantil Albert Sabin
IF	Imunofluorescência
IFI	Imunofluorescência Indireta
IRA	Infecção Respiratória Aguda
MEM-E	Meio Essencial Mínimo com sais de Earle
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAC	Pneumonia Adquirida na Comunidade
PBS	Tampão Salina Fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa
SNF	Secreção de Nasofarínge
VSRh	Vírus Sincicial Respiratório Humano

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO	13
1.1IRA E PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE	13
1.2PAC- IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA E MEDIDAS GOVERNAMENTAIS ...	13
1.3 EPIDEMIOLOGIA DAS PAC.....	15
1.4 AGENTES ETIOLÓGICOS	16
1.5 VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO.....	17
1.5.1Histórico	17
1.5.2Classificação e estrutura viral	18
1.5.3Replicação	20
1.5.4Diversidade antigênica e genômica	21
1.5.5Epidemiologia	22
<i>1.5.5.1Prevalência.....</i>	<i>22</i>
<i>1.5.5.2Sazonalidade</i>	<i>23</i>
1.5.6Transmissão e Patogênese.....	25
1.5.7Fatores de risco	27
1.5.8Resposta imunológica	28
1.5.9Manifestações clínicas	29
1.5.10Diagnóstico	30
1.5.11Profilaxia e Tratamento	32
2PERGUNTAS DE PARTIDA.....	35
3HIPÓTESE.....	35
4OBJETIVOS	36
4.1 OBJETIVO GERAL.....	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO	37
5.1.1Local do estudo	37
5.1.2Sistema de vigilância	37
5.1.3População	37

5.1.4	Tipo de estudo	38
5.1.5	Questões éticas	38
5.2	COLETA DO MATERIAL	38
5.2.1	Coleta da amostra	38
5.2.2	Coleta dos dados epidemiológicos	39
5.3	PROCESSAMENTO DA AMOSTRA	39
5.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	40
5.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PRECEDIDA POR TRANSCRIÇÃO REVERSA DO MATERIAL GENÉTICO VIRAL	41
5.5.1	Extração do material genético viral	41
5.5.2	Síntese de DNA complementar (cDNA)	41
5.5.3	Reação em cadeia da polimerase	41
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6	RESULTADOS	43
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
	APÊNDICE	63
	ANEXO	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS E PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE

As infecções respiratórias agudas (IRAs) podem ocorrer em qualquer parte do sistema respiratório e são classificadas de acordo com o sítio anatômico acometido. A infecção das vias aéreas superiores (IVAS) é o tipo mais comum e compreende a rinofaringite, faringite, amigdalite, rinosinusite e otite. A infecção das vias aéreas inferiores (IVAI) compreende a bronquite, bronquiolite aguda, laringotraqueobronquite, broncopneumonia e a pneumonia (UNICEF, 2006; WHO, 2013).

A pneumonia adquirida na comunidade (PAC) é uma infecção aguda do parênquima pulmonar que ocorre em pacientes fora do ambiente hospitalar, ou seja, acomete indivíduos na comunidade ou nas primeiras 48 horas de internação (SBPT, 2007). A PAC constitui-se na principal causa de óbito por doenças infecciosas em crianças principalmente em menores de cinco anos e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade nessa faixa etária (CHAUVET et al., 2010; RODRIGUES et al., 2011). A epidemiologia e o tratamento da PAC têm sofrido modificações nos últimos anos com o isolamento de novos patógenos e a emergência de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos tradicionais (CHAUVET et al., 2010; CORRÊA et al., 2009; LEAL et al., 2012).

1.2 PAC- IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA E MEDIDAS GOVERNAMENTAIS

No ano 2000 a Organização das Nações Unidas (ONU) aprovou um documento, denominado Declaração do Milênio que foi assinado por 192 de seus países membros da ONU. No documento constam os oito Objetivos do Milênio, que no Brasil são chamados de Oito Jeitos de Mudar o Mundo, com 24 metas e 48 indicadores, que devem ser atingidos por todos os países até 2015 (UNICEF, 2013).

O quarto objetivo visa reduzir em dois terços, até 2015, a taxa de mortalidade de crianças menores de cinco anos. De acordo com um relatório gerado pela ONU em setembro de 2013, o número mundial de mortes infantis caiu de 12,6 milhões em 1990 para 6,6 milhões em 2012. As reduções aconteceram por causa do aumento de tratamentos mais eficazes e acessíveis, melhorias das condições nutricionais, aumento do nível educacional das mães e

progressão do compromisso político. Entretanto, se o progresso não for acelerado, a meta só será cumprida em 2028 e não em 2015, como previsto (ONU, 2013). A pneumonia, a diarreia e a malária continuam sendo as principais causas de morte de crianças no mundo, matando cerca de seis mil delas por dia (UNICEF, 2013).

Visando reforçar o cumprimento das metas do 4º objetivo do milênio, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o *United Nations Children's Fund* (UNICEF) lançaram em 2013 o Plano de Ação Global Integrada para Pneumonia e Diarreia, com o objetivo de acelerar o controle da pneumonia com uma combinação de intervenções que visam proteger, prevenir e tratar a doença em crianças. As principais ações incluem a promoção do aleitamento materno exclusivo e alimentação complementar adequada; a prevenção da infecção com vacinação, lavagem das mãos dos contatos com sabão, prevenção de doenças imunossupressoras como a síndrome da imunodeficiência adquirida; o facilitamento do acesso ao tratamento. A prevenção de pneumonia em crianças é um componente essencial de uma estratégia para reduzir a mortalidade infantil e medidas como imunização contra *Haemophilus influenzae b*, pneumococo, sarampo e coqueluche tem se mostrado eficaz na prevenção da PAC (WHO, 2013).

O UNICEF reconhece o Brasil como um dos países que têm conseguido reduzir de forma significativa a taxa de mortalidade na infância por meio de estratégias efetivas, atingindo o 4º objetivo em 2012, três anos antes do prazo estabelecido. A taxa de mortalidade em menores de cinco anos no país caiu 77% entre 1990 e 2012 graças a uma combinação de estratégias: a criação de um Sistema Único de Saúde com foco na atenção primária de saúde, melhoria no atendimento materno e ao recém-nascido e esforços para prestar assistência à saúde no nível comunitário, melhoria das condições sanitárias, promoção do aleitamento materno e expansão do programa de imunização (UNICEF, 2013; ONU, 2013).

No entanto, as desigualdades econômico-sociais observadas entre as cinco regiões do Brasil apresentam reflexo na taxa de mortalidade no território nacional. Como tentativa de superar essas desigualdades firmou-se o Protocolo de Cooperação Federativa que se vale de ações cooperativas e solidárias entre a União e os estados federados com a participação dos municípios. A medida tem como objetivo principal estabelecer metas para acelerar a redução das desigualdades nas regiões com foco no Norte e Nordeste. Dentre as metas está a redução em 5% ao ano da taxa da mortalidade infantil (IBGE; IPEA; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

O objetivo foi alcançado e em 2011 a região Nordeste reduziu em média 6.6% a taxa de mortalidade infantil, que era de 70 óbitos por mil nascidos vivos em 1990 e de 20 óbitos por mil menores nascidos vivos em 2011. Também foi observada a diminuição gradativa da taxa de mortalidade infantil entre as regiões do Brasil. Em 1990 a mortalidade na região Nordeste era 2.5 vezes maior que a da Sul, diferença que foi reduzida para 1.6 vezes em 2011. A região Norte apresentou a mesma tendência na redução da mortalidade infantil (UNICEF, 2013; ONU, 2013).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DAS PACs

A incidência mundial da PAC varia com a faixa etária, sendo maior nos extremos de idade, ou seja, acometendo principalmente menores de 5 anos e maiores de 75 anos. Segundo estimativas da OMS, 450 milhões de casos de pneumonias são registrados anualmente, onde a incidência gira em torno de 0,29 episódios/ano na população menor de cinco anos, projetando um número aproximado de 150 milhões (13%) de internações por pneumonia nesta faixa etária (CALADO et al., 2010; CHAUVET et al., 2010; RUUSKANEN et al., 2011; WHO, 2013).

Assim como a incidência e taxa de internação, a taxa de mortalidade por pneumonia também é maior nos extremos de idade, chegando a atingir cerca de 6 milhões de crianças com idade inferior a cinco anos, sendo responsável por 18% de todas as mortes de crianças nessa faixa etária em todo o mundo. Dentre os indivíduos que necessitam de internação, a taxa de mortalidade por PAC varia de 5% a 12%, chegando a atingir 50% entre os que precisam de tratamento em unidades de terapia intensiva - UTI. Apesar da tendência à redução da taxa de internação por casos de PAC, a taxa de mortalidade hospitalar tem crescido, provavelmente, em virtude da internação de casos mais graves (CALADO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2011; RUDAN et al., 2008; UNICEF, 2006; WHO, 2013).

A incidência da PAC é observada principalmente em países em desenvolvimento, onde a incidência pode ser cinco vezes maior do que em regiões mais desenvolvidas (Figura 1). Observa-se a prevalência em crianças no sul da Ásia e na África sub-saariana (RUDAN et al., 2008; RUUSKANEN, et al., 2011; WHO, 2013).

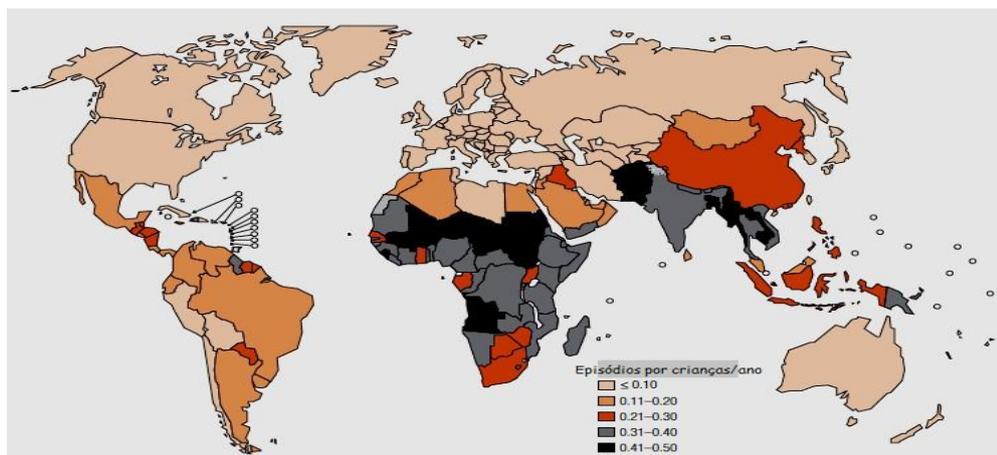


Figura 1. Incidência mundial dos casos de PAC em crianças menores de 5 anos. Adaptado de RUDAN et al., 2008.

Embora a PAC esteja relacionada entre as principais causas de morbimortalidade no mundo e seja tema de diversos estudos na área e de recentes avanços em métodos diagnósticos, calcula-se que não é possível estabelecer a precisão do agente causador dessas infecções em aproximadamente 50% dos casos (CONTERNO et al., 2011; DONALISIO et al., 2011). No Brasil, a maioria dos estudos sobre PAC diz respeito apenas ao perfil e evolução clínicos e pouco se sabe a respeito da etiologia dessas infecções (CALADO et al., 2010; ROCHA NETO et al., 2013).

1.4 AGENTES ETIOLÓGICOS DAS PACs

Dentre os agentes infecciosos que podem causar a PAC, os mais comuns são: *Streptococcus pneumoniae*-a causa mais comum de pneumonia bacteriana em crianças; *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) - a segunda causa mais comum de pneumonia bacteriana; os vírus, com destaque para Vírus Sincicial Respiratório Humano, Influenza A e B, Parainfluenza 1, 2 e 3, Adenovírus, Rinovírus, Coronavírus, Bocavírus e Metapneumovírus; e *Pneumocystis jirovecii*, fungo responsável por pelo menos um quarto de todas as mortes por pneumonia em recém-nascidos infectados pelo HIV (ALONSO et al., 2012; CALADO et al., 2010; DONALISIO et al., 2011; ROCHA NETO et al., 2013; WHO, 2013).

Com a introdução generalizada de vacinas conjugadas contra pneumococos e Hib em programas de imunização infantil, especula-se a sobre a crescente predominância dos vírus

como causas de pneumonia na infância (ROCHA NETO et al., 2013). Com isso, a atenção está se voltando para a importância dos vírus respiratórios como principais patógenos das infecções respiratórias agudas e seu papel na mortalidade infantil. O vírus sincicialrespiratório humano é o principal agente viral causador de pneumonia, além de ser a principal causa da maioria das infecções agudas virais do trato respiratório inferior em crianças, particularmente naqueles até dois anos de idade (ROCHA NETO et al., 2013; RUUSKANEN et al., 2011).

1.5 VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

1.5.1 Histórico

O vírus foi isolado primeiramente em 1955 de chimpanzés do *Walter Reed Army Institute Research Washington, D.C., USA*, que apresentaram uma síndrome respiratória contagiosa que se caracterizou por tosse, espirro e secreção mucopurulenta sendo intitulado Agente da Coriza do Chimpanzé (Chimpanzee Coryza Agente – CCA) (MORRIS, et al. 1956).

No ano seguinte, um vírus semelhante ao CCA foi isolado de uma criança com pneumonia e em outra com crupe, em Baltimore, EUA (CHANOCK & FINBERG, 1957). O agente passou a ser denominado vírus sincicial respiratório humano (VSRh) por refletir sua capacidade de formar sincícios em culturas de células e seu tropismo pelo trato respiratório humano. Posteriormente, estudos sorológicos indicaram que a infecção em recém-nascidos e crianças pelo agente era comum na época (CHANOCK et al., 1957). O vírus foi isolado pela primeira vez no Brasil por Candeiros (1964), em quatro crianças hospitalizadas com quadro respiratório agudo (CANDEIAS, 1967).

A partir disso, o VSRh foi isolado em todo o mundo. Estudos clínico-epidemiológicos o apontam, atualmente, como o principal agente causador de doenças agudas do trato respiratório inferior em lactentes e crianças (MOURA et al., 2013; EL SALEEBY et al., 2011; OHUMA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2011, RUUSKANEN et al., 2011). Segundo relatórios da OMS, a carga global da doença por VSRh é estimada em 64 milhões de casos e 160 000 mortes todos os anos. Aproximadamente 95% das crianças apresentam a primeira infecção por VSRh até os dois anos de idade com o pico de incidência ocorrendo ainda nos primeiros meses de vida (WHO, 2013).

1.5.2 Taxonomia e estrutura viral

O VSRh é classificado na ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gênero *Pneumovirus*. É um vírus envelopado, com material genético constituído de RNA de filamento único, senso negativo, não segmentado. A associação do genoma às proteínas virais forma o nucleocapsídeo helicoidal. VSRh utiliza uma RNA polimerase própria, sintetizada no interior da célula hospedeira e o processo de replicação ocorre no citoplasma (COLLINS & MELERO, 2011). A estrutura do VSRH encontra-se representada na Figura 2. O genoma do vírus possui 15,2 kb de comprimento e tem 10 genes na ordem 3'→5': NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L. O esquema representativo do genoma viral pode ser visualizado na figura 3.

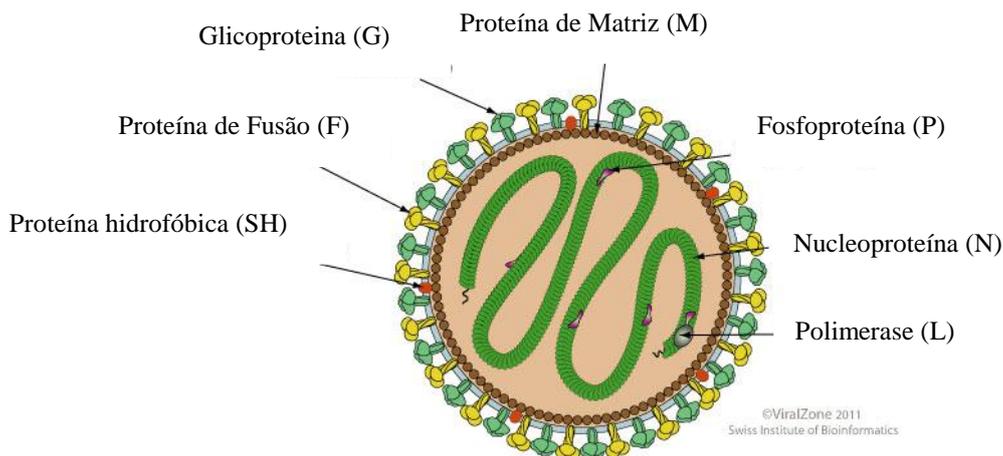


Figura 2. Estrutura do VSRH. Adaptado de: Swiss Institute of Bioinformatics. Viral Zone [database]. Suíça, SIB; 2013.

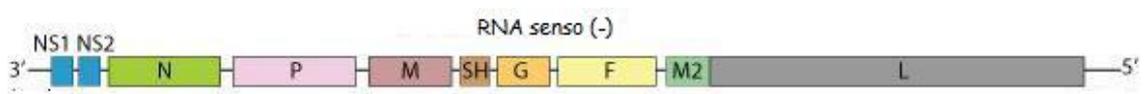


Figura 3. Representação esquemática do genoma do VSRH. FONTE: Swiss Institute of Bioinformatics. Viral Zone [database]. Suíça, SIB; 2013.

Esses genes são transcritos em dez RNAs separados que codificam 11 proteínas. Cada gene codifica um único polipeptídeo, sendo duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2), a proteína do nucleocapsídeo (N), uma fosfoproteína (P), uma proteína de matriz (M), uma pequena proteína hidrofóbica (SH), uma glicoproteína complementar/anexa (G), uma proteína

de fusão (F) e uma polimerase (L). Há uma exceção para o mRNA de M2, que codifica 2 proteínas, M2-1 e M2-2 (COLLINS & MELERO, 2011).

A proteína N possui 391 aminoácidos e peso molecular de 43,3 kDa, está associada ao RNA genômico e é a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo. O RNA genômico e anti-genômico do VSRh encontra-se sempre associado à proteína N e este complexo é usado como molde para a síntese de RNA. O complexo N-RNA previne a formação de estruturas secundárias da molécula de RNA e protege a mesma da degradação pelas nucleases (COWTON et al., 2006).

A proteína P possui 241 aminoácidos e peso molecular de 35 kDa. Por ter caráter ácido e ser uma proteína altamente fosforilada, atua na transcrição e replicação do VSRh. A proteína P constitui uma subunidade da polimerase viral e parece mediar o contato entre a proteína L e o complexo N-RNA (TRAN et al., 2007).

A proteína L é a maior proteína do VSRh. Possui 2165 aminoácidos e peso molecular de 250 kDa. É a proteína estrutural em menor abundância na partícula viral. A proteína L possui atividade enzimática de RNA-polimerase com função de replicação, além de poliadenilação e formação da estrutura *cap* do mRNA do VSRh (COLLINS et al., 2007; MASON et al., 2004).

As proteínas NS1 (139 aminoácidos; 15,5 kDa) e NS2 (124 aminoácidos; 14,6 kDa) atuam como agentes antagonistas ao interferon (INF) na resposta imune inata antiviral. Conjuntamente, as proteínas NS1 e NS2 medeiam a degradação das proteínas hospedeiras STAT-2 e *elongin-cullin* E3 ligase e inibem a morte celular (apoptose) de forma prematura, facilitando o crescimento e a replicação viral na célula hospedeira (TRISTAM & WELLIVER, 1995).

A proteína M possui 256 aminoácidos e peso molecular de 27 kDa. É uma proteína interna não glicosilada que está associada ao nucleocapsídeo do VSRh e pode inibir a transcrição viral assim como outras proteínas de matriz de um vírus de RNA fita negativa. A associação da proteína M com o nucleocapsídeo facilita a montagem do vírus (GHILDYAL et al., 2002; TRISTAM & WELLIVER, 1995).

A proteína M2-1 é uma proteína interna, não glicosilada e interage com as proteínas N e P. Atua no processo de transcrição, facilita a síntese completa do mRNA do VSRh e ainda permite o trânsito da polimerase através da região intergênica para acessar promotores gênicos distais. Essa proteína tem função muito importante na replicação do VSRh e qualquer

alteração em sua sequência diminui consideravelmente a infectividade do vírus (TANG et al., 2001; TRISTAM & WELLIVER, 1995).

A proteína M2-2 possui 90 aminoácidos e possui peso molecular de 11 kDa e está relacionada à regulação da transcrição e replicação da molécula de RNA do vírus. Quando expressa em altos níveis, M2-2 inibe completamente a replicação do VSRh, podendo ser considerado um fator crítico na replicação viral quando produzida em células infectadas (CHENG et al., 2005; TRISTAM & WELLIVER, 1995).

A proteína SH possui 64 aminoácidos e peso molecular 7,4 kDa. Esta pequena proteína forma um canal iônico próton seletivo na membrana citoplasmática da célula hospedeira, atuando durante a montagem e no processo de entrada do vírus na célula hospedeira, além de apresentar função de resposta contra a imunidade inata da célula (COLLINS et al., 2001; FUENTES et al., 2007; RIXON et al., 2004).

A glicoproteína de fusão F possui 574 aminoácidos e peso molecular de 70 kDa. Está ancorada à membrana, próximo à região carboxila-terminal e contém uma sequência sinal de clivagem próximo à região amino-terminal, na parte externa da membrana citoplasmática. É responsável pela ligação do envelope viral com a membrana citoplasmática da célula, liberando o nucleocapsídeo diretamente dentro do citoplasma, além de proporcionar a fusão da célula infectada com uma célula adjacente, promovendo a formação de sincícios (COLLINS et al., 2007).

A glicoproteína G possui entre 289 a 319 aminoácidos e peso molecular, na sua forma madura, de 90 kDa. Está ancorada à membrana próxima à região amino-terminal por um domínio hidrofóbico, não clivável, do tipo âncora. Devido à sua composição, foi sugerido que a glicoproteína G do VSRh se assemelhe às mucinas secretadas pelas células epiteliais. Estudos demonstraram que a glicoproteína G liga-se à membrana citoplasmática, na superfície da célula hospedeira, interagindo com o heparan sulfato, sendo importante na ligação do vírus à célula hospedeira no início da infecção (TRISTAM & WELLIVER, 1995).

1.5.3 Replicação

A transcrição e replicação do material genético do VSRh segue o modelo geral dos vírus da ordem *Monomegavirales* onde os *Pneumovirus*, assim como os *Mobiliviruses*, diferente dos outros gêneros, não possuem atividade de neuraminidase. Após a adsorção do

vírião à célula hospedeira ocorre a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. Esse evento, conhecido como desnudamento, é mediado pela glicoproteína de superfície F que é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana celular, promovendo a liberação do nucleocapsídeo diretamente no citoplasma da célula hospedeira (TRISTAM & WELLIVER, 1995).

Após esse evento, tem início o processo de transcrição do genoma viral. A enzima RNA polimerase RNA-dependente adere-se à região *leader* que se localiza na extremidade 3' do genoma e não apresenta atividade codificadora. O resultado da transcrição é a síntese de um conjunto de mRNAs subgenômicos, que parecem ser cópias exatas do gene, ou seja, sem evidências de modificações. Os mRNAs recebem um cap na extremidade 5' e são poliadenilados na extremidade 3' (COLLINS et al., 2007).

A maturação do vírus ocorre com a montagem do nucleocapsídeo pela combinação da proteína N com o RNA genômico, seguida da adição das proteínas P e L. A montagem do envelope ocorre com as glicoproteínas virais, modificadas pós traducionalmente por glicosilação durante seu transporte através do retículo endoplasmático e complexo de Golgi, ocupando o lugar das proteínas celulares na membrana plasmática. Em seguida, as proteínas da matriz se agregam na porção interna do envelope nascente. Após isso, ocorre o brotamento, onde o nucleocapsídeo alcança a superfície levando consigo uma porção da membrana plasmática da célula hospedeira (COLLINS *et al.*, 2007).

1.5.4 Diversidade antigênica e genômica

A primeira observação das diferenças antigênicas entre linhagens distintas de VSRh foi relatada em 1963 pelos pesquisadores Coates, Kendrick e Chanock. Esse estudo foi realizado entre duas amostras denominadas A1 e Long. Posteriormente, Coates e colaboradores observaram diferenças antigênicas entre outras amostras virais: Long, isolada em 1956 de uma criança com pneumonia; e CH18537, isolada em 1962 de uma criança com infecção aguda do trato respiratório superior (COATES et al., 1963).

Com o advento dos anticorpos monoclonais essas diferenças antigênicas puderam ser mais bem definidas. A variabilidade antigênica pode ser visualizada pela diferença de títulos de anticorpos neutralizantes. Foram examinados anticorpos monoclonais para as proteínas P e N e para as glicoproteínas F e G e com base na reatividade entre eles foi estabelecida a

divisão do VSRh em dois grupos antigênicos, A e B (ANDERSON et al., 1985; COATES et al., 1966; MUFSON et al., 1985).

No mesmo período, estudos mostraram que os dois grupos do VSRh tem em torno de 25% de relação antigênica e que o dimorfismo antigênico entre os grupos é maior na glicoproteína G. Esta característica confere vantagem para o vírus em termos de escape de uma resposta imune pré-existente. A proteína F apresenta uma correlação antigênica de 50% entre os grupos A e B (CANE et al., 1991; MUFSON et al., 1985; SULLENDER et al., 1998).

Pesquisas posteriores demonstraram diversidades antigênicas dentro de um mesmo grupo, possibilitando a divisão em subgrupos. Baseados em estudos moleculares, pesquisadores classificaram os genótipos do grupo A em: GA1-GA7, SSA1, NA1-NA2, ON1; e do grupo B em:GB1 -GB4, BA1-BA10, SAB1-SAB3 (CUI et al., 2013).

1.5.5 Epidemiologia

1.5.5.1 Prevalência

O VSRh é observado causando IRAs por todo o mundo, sendo responsável por cerca de 2.88% a 81.8% de IRAs infantis a nível mundial (HSU et al., 2014; LUCION et al., 2014).

Na Ásia, a menor prevalência do vírus foi relatada em estudo realizado em Taiwan, onde Hsu e colaboradores encontraram o VSRh em menos de 3% das amostras pesquisadas. Entretanto, outras pesquisas asiáticas encontraram o vírus causando 19.3% das IRAs investigadas em estudos realizados nas Filipinas (OHNO et al. 2013), 33.1% na China (HUO et al., 2013) e em até 70.6% em um estudo retrospectivo de 27 anos na Malásia (KHOR et al. 2012).

Na Europa o VSRh foi encontrado causando de 20% (CANTAIS et al., 2014) a 70% (GIMFERRER et al., 2015) das infecções virais infantis na França e Espanha, respectivamente. Já na África a média das infecções respiratórias pelo VSRh não passa de 30% (MOYES et al., 2013). Embora haja poucas publicações recentes na Oceania, um estudo australiano mostrou que o vírus participa significativamente na etiologia das IRAs locais, sendo encontrado em até 31.3% dessas infecções (BREALEY et al., 2013). Nas Américas, o vírus pode ser encontrado desde prevalências baixas (8.9%) na Colômbia (BARBOSA-

RAMIREZ et al., 2014) e intermediárias (48.2%) no Canadá (PAPENBURG et al., 2012) a até 81.8% em infecções na Argentina (LUCION et al., 2014).

No Brasil, o VSRh é responsável por uma parcela significativa das IRAs virais infantis. Na região Norte, o vírus é encontrado em 23.1% das infecções respiratórias infantis, segundo estudo realizado em Belém – Pará (LAMARÃO et al., 2012); no Nordeste o vírus é encontrado de 15 % no Ceará (MOURA et al., 2013) a 37% em Pernambuco (BEZERRA et al., 2011); na região Sul em até 59% de crianças hospitalizadas com BVA no Rio Grande do Sul (DALL’ONDER et al., 2014); na região sudeste o vírus foi encontrado em 21.4% das IRAs infantis no Rio de Janeiro (RIBEIRO et al., 2011), 35.6% em Minas Gerais (SILVEIRA, 2013) e de 29% das IRAs infantis adquiridas na comunidade, já em casos de internações por pneumonias virais em São Paulo o VSRh foi associado com até 80.4% dessas infecções (PAULIS et al., 2011).

1.5.5.2 Sazonalidade

Asazonalidade do VSRh é uma característica marcante do vírus em países de clima temperado dos hemisférios norte e sul, onde a sua ocorrência está associada ao período de inverno e a baixas temperaturas. Em países de clima tropical há uma menor regularidade na ocorrência desses vírus, havendo lugares por onde a associação entre os períodos epidêmicos do VSRh e a estação de chuva, enquanto que em outros países o VSRh se distribui ao longo do ano sem um período epidêmico definido (BARDACH et al., 2014).

A sazonalidade do vírus é bem definida em países de clima temperado e em alguns países de clima tropical. As infecções provocadas pelo vírus correspondem a epidemias anuais com intervalo de tempo regular, sendo essa sazonalidade uma característica marcante do vírus. Os períodos epidêmicos variam com o clima e pluviosidade de cada região. Países do hemisfério Norte com clima tropical apresentam as mesmas características de sazonalidade do VSRh, ou seja, o pico de detecção ocorre nas estações de outono e inverno – meses mais frios do ano (AMBROSINI et al., 2014; FENG et al., 2014; HAYNES et al., 2014). Entretanto, alguns países do hemisfério Norte apresentam clima subtropical, alterando a sazonalidade do VSRh (HSU et al., 2014). Na Ásia, o vírus foi encontrado em surtos entre os meses de setembro e maio na Coreia do Sul (BAEK et al., 2012) e entre dezembro e março em Israel

(HIRSH et al., 2012), Filipinas (OHNO et al., 2013) e Índia (CHOULDHARY et al., 2013). Em alguns países da Europa o vírus apresenta o mesmo padrão, como na Espanha (GIMMFERRER et al., 2015) e Alemanha (PFEIL et al., 2014), onde as infecções por VSRh ocorrem principalmente no inverno.

No Hemisfério Sul a sazonalidade do vírus está intimamente relacionada com o período de chuvas. No entanto, esse padrão difere claramente entre os países do hemisfério devido o período de chuvas ser irregular entre os países de clima tropical. A sazonalidade do VSRh não é completamente definida em algumas regiões do hemisfério Sul. Na África, por exemplo, os picos do vírus não apresentam correlação com o clima, enquanto na África do Sul o pico do vírus foi detectado entre fevereiro e maio. Estudos realizados em alguns países da América do Sul apontam correlação entre o aumento dos casos de IRAs por VSRh e o período chuvoso, como na Colômbia (RAMIREZ, et al., 2014), Argentina e no Chile (BARDACH et al., 2014), onde a circulação de VSRh segue um padrão, onde a temporada começa em abril, apresenta picos em junho-julho e cai em setembro.

Os dados obtidos a partir do Instituto de Higiene na cidade de Guayaquil no Equador mostra um padrão diferente para a circulação do vírus em países tropicais, em que o VSRh predomina durante o primeiro semestre do ano; este padrão é semelhante ao obtido no norte do Brasil, em Belém do Pará, pelo Instituto Evandro Chagas (BARDACH et al., 2014).

No Brasil a diversidade climática provoca uma variação da sazonalidade entre as diferentes regiões do país, mostrando assim a importância dos estudos de vigilância regionais como fontes de informação, tanto para discernir os padrões de infecção como para identificar as populações de pacientes que apresentam um risco grave de desenvolver doença séria por infecção por VSRH (SBPT, 2007).

A variação do VSRh no Brasil foi caracterizada em um estudo de revisão realizado por Freitas (2013) que avaliou dez anos de sazonalidade e circulação do vírus no país. De acordo com os trabalhos publicados entre os anos de 2000 e 2010 citados por Freitas, a nível nacional, o vírus foi encontrado principalmente nos meses de abril e maio, corroborando com estudo realizado por Arruda e colaboradores (2014), entretanto esse padrão não foi encontrado em todas as regiões. Durante a década analisada, na região Norte o pico de VSRh foi extenso, se estendendo de abril a agosto; na região Nordeste, entre maio e junho; na região Centro-Oeste, entre fevereiro a maio; na região Sudeste, entre março e abril; na região Sul: entre junho e julho.

Em Salvador – Bahia, Nordeste do Brasil, o período de epidemia do VSRh dura em média sete meses, de fevereiro a agosto, com pico de ocorrência em maio e junho, coincidindo com a estação chuvosa (MOURA et al., 2003). A mesma correlação entre o pico das infecções pelo vírus e os meses chuvosos foi observado no estado do Pará, região Norte (LAMARÃO et al., 2012) e em Pernambuco (BEZERRA et al., 2011). Em Fortaleza, capital do Ceará, o VSRh apresenta surtos anuais concordantes com a temporada de chuvas, que ocorre geralmente no primeiro semestre (ALONSO et al., 2012; MOURA et al., 2006, 2013).

São Paulo, na região Sudeste do Brasil, apresenta surtos de VRSh que começam no final do outono ou no início do inverno, com picos em maio e com duração de 5 meses (ARRUDA et al., 2014; THOMAZELLI et al., 2007). No Rio de Janeiro os surtos também foram observados como um padrão dependente da temperatura, com picos em maio e junho, meses com as mais baixas médias de temperatura (RIBEIRO, et al., 2011; D'CELIA et al., 2014).

Estudos na região Sul encontraram que a infecção por VSRh apresenta uma frequência baixa entre abril e maio e um pico máximo em julho e agosto, correlacionada com a temperatura média mínima mensal (STRALIOTTO et al., 2002). Esse padrão sazonal está mais próximo do padrão de infecção da região Sudeste do que a de outras regiões no Brasil. Ambas as regiões apresentam comportamento sazonal para o VSRh semelhantes ao comportamento de outros países da América Latina como Chile e Argentina (LUCHSINGER, et al., 2014; MARCONE et al., 2013).

1.5.6 Transmissão e Patogênese

O VSRh é considerado um dos mais contagiosos patógenos humanos e tem seu alto poder infectante comparável ao do vírus do sarampo. O vírus é facilmente adquirível e se dissemina com facilidade em indivíduos através do contato direto, comum em hospitais, asilos, creches e entre familiares. A alta infectividade do vírus contribui para epidemias anuais e alta frequência de reinfecção (COLLINS et al., 2008).

A transmissão do vírus ocorre pela inoculação direta de secreções contagiosas por aerossóis ou mãos contaminadas, geralmente nos olhos e nariz, ou por fômites contaminados.

Após um período de incubação, que varia de dois a oito dias, o VSRh se replica no epitélio da nasofaringe, com propagação para a parte inferior do trato respiratório um a três dias após a infecção. Crianças secretam o vírus por aproximadamente 9 dias, período que pode se estender por até três semanas após à infecção (LESSLER et al., 2009; SILVA et al., 2009).

A sobrevivência do vírus na pele é de aproximadamente uma hora, no entanto, em superfícies abióticas, o VSRh pode permanecer viável por até 6 horas sem perder sua capacidade infectante. Essa característica faz com que o VSRh seja associado a infecções tanto comunitárias quanto nosocomiais, sugerindo assim que a transmissão do VSRh em ambiente hospitalar seja semelhante à transmissão do vírus na comunidade, com maior atenção para os objetos contaminados. A viabilidade prolongada do VSRh na pele, tecido e outros objetos enfatiza a importância da vigilância de fômites, da lavagem das mãos e do isolamento do paciente como forma de controlar a infecção nosocomial (SILVA et al., 2009).

A patogenia do VSRh é responsável por infecções do trato respiratório que variam desde infecções graves a doenças leves (WHO, 2013). O trato respiratório humano é dividido em superior e inferior, sendo a porção superior colonizada por uma gama de microorganismos residentes, além de ser constantemente exposta a patógenos inalados e outras substâncias potencialmente nocivas. Em contrapartida, o trato respiratório inferior é estéril.

A fisiopatologia da infecção pelo VSRh ainda não é totalmente conhecida. Sabe-se que a infecção é normalmente restrita às células superficiais do epitélio respiratório. Os principais alvos da infecção nas vias aéreas inferiores são as células ciliadas encontradas nos bronquíolos e os pneumócitos tipo 1 nos alvéolos. É provável que outras células, incluindo células epiteliais não-ciliadas e células dendríticas também sejam infectadas, entretanto as células basais parecem ser poupadas. Uma das principais características da infecção por VSRh é a infecção de células contíguas por um processo de fusão celular gerando a formação de sincício (COLLINS et al., 2008).

Em achados histopatológicos, observa-se necrose das células epiteliais, proliferação ocasional do epitélio bronquiolar, infiltrado de monócitos e células T nas arteríolas brônquicas e pulmonares, assim como a presença de neutrófilos entre estruturas vasculares e pequenas vias aéreas. As alterações provocadas pela infecção por VSRh levam à disfunção do movimento mucociliar, com acúmulo de secreções e detritos, facilitando a formação de muco, descamação do epitélio, e conseqüentemente edema da mucosa brônquica. Como resultado, há obstrução parcial ou completa das vias respiratórias distais, levando à hiperinsuflação

pulmonar ou atelectasia, promovendo hipoxemia e hipercapnia (COLLINS et al., 2008; WHO, 2013).

1.5.7 Fatores de risco

No que diz respeito aos fatores relacionados ao hospedeiro, o risco de infecção pelo VSRh é aumentado por fatores que comprometem a capacidade de controle e resolução de uma infecção do trato respiratório como a idade, nascimento prematuro, displasia broncopulmonar, cardiopatia congênita, imunodeficiência ou imunossupressão, infecções precoces/recorrentes por VSRh, desenvolvimento incompleto, dano ou hiper-reatividade das vias aéreas, baixo peso ao nascer, sexo masculino, baixo título de anticorpos maternos específicos para VSRh e deficiência de vitamina D no sangue (BELDERBOS et al., 2011; EL SALEEBY et al., 2011; GROSKREUTZ et al., 2009; VAN BLEEK et al., 2011).

Há indicação de que a predisposição genética tenha papel importante na doença grave por VSRh. A hipótese parte da associação de suscetibilidade de indivíduos com doença grave e histórico familiar de asma ou doença grave do trato respiratório inferior na infância, assim como de observações entre diferenças étnicas, raciais e grupos de gênero na manifestação das síndromes clínicas. Atualmente, estudos mostram a relação entre o aumento de casos graves infantis por infecção por VSRh e polimorfismos genéticos. Os principais polimorfismos incluem alterações nos genes de defesa inatos, genes das proteínas do surfactante, genes de receptores de células hospedeiras, genes de resposta por neutrófilos, genes de resposta Th1/Th2 e genes efetores da imunidade adaptativa. (PAULUS et al., 2007; PUTHOTHU et al., 2007).

Apesar da associação entre a gravidade da infecção e diversos fatores de risco como contato com fumante, prematuridade, doença subjacente e fatores genéticos desempenharem papéis importantes na infecção pediátrica pelo VSRh, mais de dois terços das hospitalizações pediátricas envolvem crianças previamente saudáveis (AMORIM et al., 2012; COLLINS et al., 2008; WHO, 2013).

Alguns fatores ambientais colocam em risco a saúde do indivíduo e agravam o quadro da infecção por VSRh. Aglomerações como creches, asilos e superlotação de moradia, assim como estadia prolongada em hospital estão entre os principais fatores ambientais listados. Dentre esses, é constatado que o contato com fumantes é o que mais contribui para a

gravidade da infecção (OHUMA et al., 2012; PAPPENBURG et al., 2012; VAN BLEEK et al., 2011; LITTEL-VAN DEN HURK & WATKISS, 2012).

Dentre as principais características virais associadas com o grau da patogênese estão a alta infectividade e poder de invasão, tropismo pelas células epiteliais superficiais do trato respiratório, expressão dos antagonistas tipo I de IFN, inibição da apoptose por múltiplas proteínas virais, propriedades antigênicas incomuns das proteínas virais, variabilidade antigênica, interferência da função normal dos macrófagos e células dendríticas e deficiência na resposta imunológica protetora provocada por mecanismos de escapes virais (COLLINS & GRAHAM, 2008).

A variação antigênica e diversidade das cepas são os aspectos mais estudados por apresentarem grande importância na patogênese do VSRh. O vírus possui um único sorotipo e dois subgrupos antigênicos (A e B) (MUFSON et al., 1985). A diferença entre a virulência dentre os subgrupos A e B ainda não está bem elucidada, embora alguns estudos tenham descrito que as cepas do subgrupo A são as mais associadas com o aumento da gravidade da doença (COLLINS & GRAHAM, 2008; LUKACS et al., 2006).

A diferença estimada entre os subgrupos A e B do VSRh confere uma vantagem de quatro vezes no quesito reinfecção. As epidemias geralmente envolvem múltiplas cepas circulantes em que o subgrupo A e B podem alternar em predominância a cada 1 ou 2 anos, independente da sazonalidade (COLLINS & GRAHAM, 2008; ZLATEVA et al., 2005).

1.5.8 Resposta imunológica

A infecção das vias aéreas inferiores está comumente associada com obstrução respiratória e consequente hipóxia em crianças. Esse fato relaciona-se com a produção aumentada de citocinas, como IL-4, que medeia a produção de anticorpos da classe IgE, mediando portanto, processos alérgicos e pela produção de citocinas pro-inflamatórias (GRAHAM et al., 2011).

A infecção pelo VSRh aumenta a síntese de diversas citocinas pró-inflamatórias como IL-8, IL-1, IL-6 e IFN que podem contribuir para bronquiolite e para asma ao induzir inflamação com quimiotaxia de eosinófilos. Além disso, a infecção pelo VSRh induz a produção de citocinas padrão Th2 como IL-13, IL-4 e IL-5 que podem estimular a produção de IgE. Ao entrar em contato com a mucosa, o VSRh é absorvido, processado e apresentado

pelas células apresentadoras de antígenos às células efetoras do sistema imune. A ligação direta entre o ambiente externo e tecido linfático acelera o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa específica ao patógeno, como também fornece ao patógeno acesso direto para as células do sistema imunológico (SATO& KIYONO, 2012).

A replicação do vírus e a resposta do hospedeiro contribuem para a morte de células epiteliais transitórias e residentes do trato respiratório, levando a uma perda da integridade da barreira epitelial e da microarquitetura pulmão. A eliminação do antígeno viral inativa o sinal inicial para a ativação de células imune inata e adaptativa, reduz a ação das células T regulatórias e a expressão de citocinas reguladoras, culminando numa resposta inflamatória (GORSKI et al., 2012). O processo de reparação ainda consta do auxílio de indutores de tecido linfóide (LTi), células LTI-like, citocinas e macrófagos ativados, culminando em indução de uma resposta pró-fibrótica(LITTLE-VAN DEN HURK et al., 2007; LITTLE-VAN DEN HURK & WATKISS, 2012).

Histologicamente, os sinais de recuperação são aparentes dentro de alguns dias após o início dos sintomas, mas as células epiteliais ciliadas raramente aparecem antes de duas semanas. O re-estabelecimento completo requer de quatro a oito semanas, em correlação com a clínica. Uma melhor compreensão da regulação desses processos diferentes pode levar a novas abordagens terapêuticas de recuperação acelerada (LITTLE-VAN DEN HURK& WATKISS, 2012).

1.5.9 Manifestações clínicas

Os sintomas de pneumonias virais são numerosos e muitas vezes aparecem de forma gradual. Alguns sintomas comuns de pneumonia em crianças recém-nascidos incluem tosse, febre e cansaço, podendo estar associados a outros sintomas como calafrios, dores de cabeça, perda de apetite, tiragem - intercostal, subcostal e/ou supraclavicular e sibilância (característica típica de infecções virais). Em casos mais graves da doença observa-se também, perda de consciência, convulsões, hipotermia, cianose e alteração sensorial (AMORIM et al., 2012; NEUMAN et al., 2011; VERAS& SAKAE, 2011).

Os sintomas da PAC causada por VSRh variam entre os indivíduos acometidos. Enquanto a maioria das crianças saudáveis pode combater a infecção com suas defesas naturais,

as crianças cujos sistemas imunológicos são comprometidos apresentam maior risco de desenvolver quadros graves de pneumonia (AMORIM et al., 2012; WHO, 2013).

Crianças portadoras de alguma comorbidade ou fator de risco evoluem para um quadro clínico mais grave, com acometimento importante do trato respiratório inferior, desenvolvendo quadros graves de pneumonia, levando muitas vezes o paciente à hospitalização. A magnitude das manifestações clínicas depende de fatores inerentes tanto ao hospedeiro quanto ao vírus, tópicos pré-citados (LITTEL-VAN DEN HURK & WATKISS, 2012; OHUMA et al., 2012; PAPENBURG et al., 2012).

1.5.10 Diagnóstico

O diagnóstico efetivo das infecções respiratórias virais assim como o reconhecimento e entendimento dos benefícios e limitações dos testes laboratoriais são importantes para evitar o uso indevido de antibióticos e prevenir infecções hospitalares, as quais o VSRh aparece frequentemente envolvido (HENRICKSON & HALL, 2007).

Os principais espécimes clínicos utilizados em estudos etiológicos de PAC são: aspirado de nasofaringe ou lavagens; swabs de nasofaringe, nariz ou garganta e seus combinados; expectorado e escarro induzido; secreção traqueal, lavado broncoalveolar e punção pulmonar (CHAUVET et al., 2010; CORRÊA et al., 2009; RUUSKAREN et al., 2011). O emprego do aspirado/lavado nasal permite um aumento significativo na detecção de vírus respiratórios quando comparado a swabs de nasofaringe e/ou garganta, independente da técnica utilizada para a detecção viral (RUOHOLA et al., 2009). Além do mais, o aspirado nasal oferece a vantagem adicional de estabilidade das amostras fixadas em lâminas (LIEBERMAN et al., 2009).

Em crianças, o aspirado nasofaríngeo é geralmente considerado o modelo de escolha, porque permite a coleta de amostra de muco nasal e da nasofaringes simultaneamente (LOENS et al., 2009; RUOHOLA et al., 2009). Entretanto, a escolha desse espécime clínico apresenta algumas limitações. A detecção de um vírus na nasofaringe pode representar coincidência com agentes de infecções do trato respiratório superior com agentes causadores de pneumonia (LIEBERMAN et al., 2009; RUUSKAREN et al., 2011).

O diagnóstico pode ser de forma direta através da detecção de antígenos virais, do ácido nucleico ou do vírus infectante; ou indireto, através de detecção de anticorpos específicos para o agente viral. Os principais métodos diagnósticos para VSRh incluem a cultura de células; detecção do antígeno por imunofluorescência (IF) ou por ensaio imunoenzimático (ELISA); detecção do RNA viral por reação em cadeia pela polimerase após a transcrição reversa (RT-PCR); sorologia, pela detecção de IgM específico para o VSRH ou pelo aumento significativo dos anticorpos IgG (FALSEY e WASH, 2000; ROVIDA et al., 2005).

A cultura de células é considerada o padrão ouro para diagnóstico das viroses respiratórias, entretanto, devido ao alto custo e dificuldades na reprodução da técnica, vem sendo substituída pelos métodos moleculares. Para o VSRH a cultura tem sido mais difícil do que para outros vírus respiratórios, porque o vírus é mais lábil, e amostras têm de ser mantidas à temperaturas muito baixas. A sensibilidade do isolamento viral em tubo convencional quando comparada com técnicas de detecção rápida do antígeno, como por IF, varia de 57 a 90% e a especificidade está próxima a 100% (MAHONY, 2008).

A técnica de IF, tanto direta quanto indireta, é amplamente utilizada na detecção do VSRh, seja para a pesquisa de antígenos virais em células epiteliais de nasofaringe ou para a confirmação do isolamento viral em cultura celular. É um teste rápido e de fácil execução quando comparado às outras técnicas. Os padrões de IFI observados dependem dos anticorpos monoclonais utilizados, se contra as glicoproteínas de superfície G e F (padrão de fluorescência na membrana) ou contra as proteínas do nucleocapsídeo N e P (padrão de fluorescência citoplasmático) (TRISTAM & WELLIVER, 1995).

A IF apresenta sensibilidade em torno de 80% a 97% e especificidade de 90% quando comparada com o isolamento viral (KELLOGG, 1991; TRISTAM & WELLIVER, 1995) e já se mostrou mais sensível que a cultura em alguns casos (TAKIMOTO et al., 1990). Juntamente com o teste de ELISA, são as técnicas mais utilizadas para a detecção de antígenos virais. São encontradas em formas de *kits* comerciais e podem ser utilizadas isoladas e como confirmação de isolamento viral (COLLINS et al., 1996). Embora haja semelhança entre os resultados obtidos por ambas as técnicas, a IF apresenta maior sensibilidade, sendo considerado método de referência no diagnóstico rápido do VSRH (SALOMÓN et al., 1989).

O advento da biologia molecular possibilitou novos métodos diagnósticos para o VSRh. Descrita originalmente por Kary Mulli em 1983, a reação em cadeia da polimerase (PCR) se baseia na maquinaria de replicação do DNA. Para que ocorra a reação, é necessário a amostra do material genético, DNA, e um *mix* de reagentes contendo água, tampões, cloreto de magnésio, uma enzima polimerase e os *primers* iniciadores. A reação consiste em três etapas repetitivas: desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* e extensão dos iniciadores. A presença dos produtos de amplificação da PCR muitas vezes é avaliada inicialmente examinando-se os produtos após a eletroforese em gel corado com brometo de etídio (BARRA et al., 2012).

Devido à emergência de novos micro-organismos, foram realizadas algumas modificações na reação de PCR padrão que expandiram o uso desse teste e ampliaram o espectro de detecção viral. Essas modificações são bem padronizadas e foram introduzidas como técnicas de rotina em laboratórios de pesquisas. Um exemplo dessa modificação é a transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) e visa a amplificação e detecção do RNA alvo. A RT-PCR é particularmente útil para a detecção de vírus de RNA. Uma enzima transcriptase reversa (RT) é adicionada à amostra, antes da etapa de PCR, induzindo a produção de uma cópia de DNA a partir do seu genoma de RNA. O cDNA criado pela RT pode ser formado usando-se iniciadores de oligonucleotídeos específicos ou hexâmeros oligonucleotídicos ao acaso. Após essa etapa, segue a PCR convencional (BARRA et al., 2012).

A técnica de RT-PCR fornece resultados rápidos e apresenta sensibilidade e especificidade superiores à IF. Entretanto, por ser dispendiosa, a técnica ainda não é utilizada na rotina diagnóstica na maioria dos laboratórios (TRISTAM & WELLIVER, 1995).

1.5.11 Profilaxia e Tratamento

Na tentativa de obter imunidade contra a infecção por VSRh, foram utilizadas diversas estratégias para a produção de uma vacina, como vírus recombinantes, peptídeos sintéticos, vacinas de DNA e vírus atenuados. Embora existam alguns estudos em fase de testes clínicos, até o momento não existe nenhuma vacina aprovada para o uso clínico (BARICK & BRITKO, 2006; COLLINS et al., 2001).

Um desafio para a produção de uma vacina contra o vírus está relacionado ao fato da possibilidade de reinfecção na presença de imunidade pré-existente, podendo acometer recém-

nascidos imunizados de forma passiva pela mãe ou em indivíduos imunocompetentes. Essas reinfecções ocorrem devido à exposições repetidas a isolados do vírus, uma vez que a imunidade conferida não é completa e dura pouco tempo (HALL et al., 1991).

Outra característica reside no fato de que a primeira infecção ocorre geralmente nos primeiros meses de vida, portanto, uma vacina eficaz tem que conferir boa imunidade até os dois meses de vida. Com isso, a imaturidade do sistema imune do indivíduo nessa idade torna-se fator de complicação para o desenvolvimento da vacina. Além disso, a maioria dos indivíduos que apresentam doença grave por infecção por VSRh apresentam algum tipo de comorbidade ou fator de risco, limitando a aplicação de uma possível terapia (GREENBERG & PIEDRA, 2004).

O tratamento padrão das infecções respiratórias por VSRh consiste na remoção mecânica das secreções, nebulização, posicionamento adequado da criança a fim de facilitar os movimentos da respiração, assistência respiratória, administração de oxigênio umidificado, uso de broncodilatadores, além de outras medidas sintomáticas. Uma terapia efetiva ainda não está disponível e a eficácia de corticoesteróides e broncodilatadores ainda não está bem definida (COLLINS et al., 1996).

A ribavirina (Ribavirin®) foi a primeira droga licenciada para o tratamento da infecção por VSRh; é um análogo de nucleosídeo e interfere com a replicação tanto de vírus de DNA quanto RNA. Apesar de exibir atividade potente contra o VSRh em cultura de tecidos e animais experimentais, o uso clínico da ribavirina é limitado devido à falta de eficácia comprovada, dificuldade de administração e risco de toxicidade (JAFRI, 2003; XU et al., 2004).

Quando administrada oralmente, a ribavirina apresenta moderada toxicidade hepática e da medula óssea e quando aplicada sob aerossol parece apresentar pouca ou nenhuma toxicidade sistêmica. Além disso, o tratamento com a ribavirina requer altas doses para ser eficaz e a administração por aerossol é prolongada, durando de 12 a 18 horas diárias por cerca de uma semana (XU et al., 2004).

Baseado no exposto, a ribavirina possui eficácia e uso limitados e não é recomendada para o tratamento de rotina da infecção por VSRh. Seu uso limita-se ao tratamento de indivíduos de alto risco, muitas vezes em combinação com imunoglobulina intravenosa VSRh-neutralizante e corticosteróides, mas a eficácia permanece controversa (RODRIGUEZ 1999).

O palivizumabe (Synagis®) é um tratamento profilático contra uma série de infecções virais do trato respiratório inferior e mostra-se eficaz em reduzir hospitalizações de neonatos e crianças com alto risco de infecção pelo VSRh. O palivizumabe é um anticorpo monoclonal IgG1 humanizado, direcionado para um epítipo no sítio antigênico A da proteína de fusão do VSRh. Esse anticorpo monoclonal humanizado é composto de 95% de sequências de aminoácidos humanos e 5% de murinos. Possui potente atividade neutralizante, inibindo a fusão celular induzida pelo vírus e protegendo contra à infecção por VSRh (FELTS & SONDEHEIMER, 2007).

O palivizumabe foi inicialmente licenciado nos Estados Unidos em 1998 e na Europa em 1999 com extensão de seu licenciamento em 2003. Nos Estados Unidos a profilaxia nos grupos de alto risco reduziu as taxas de hospitalização em até 78% nos últimos anos. No entanto, o uso profilático de palivizumabe em grupos não selecionados resulta em aumento significativo nos custos e nenhuma redução nas taxas de mortalidade. O palivizumab foi autorizado para a prevenção de infecções graves do trato respiratório inferior pelo VSRh que requerem internação em crianças com maior risco de infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

2 PERGUNTAS DE PARTIDA

- Qual o percentual de infecções por VSRh em pneumonias adquiridas na comunidade nos anos de 2010 e 2011 na cidade de Fortaleza-Ce?
- Qual a sensibilidade e especificidade da imunofluorescência em relação à RT-PCR no estudo?
- Qual o percentual de aumento de detecção de VSRh com o uso da RT-PCR?

3 HIPÓTESE

- O uso da técnica de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa do RNA viral (RT-PCR) aumentará significativamente o total de amostras positivas para o VSRh.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o percentual de detecção de VSRh em casos de PACem Fortaleza nos anos de 2010 e 2011 com a utilização da imunofluorescência indireta (IFI) e da reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa do RNA viral (RT-PCR).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da IFI em relação à RT-PCR.
2. Verificar se a utilização de RT-PCR modifica a sazonalidade já descrita de VSRh em Fortaleza.
3. Demonstrar se há variações na intensidade e extensão dos períodos epidêmicos de VSRh nos dois anos de estudo.
4. Definir o gênero e faixa etária da população de estudo para casos negativos e positivos para VSRH.
5. Definir os fatores de risco e comorbidades relacionados à população de estudo para casos negativos e positivos para VSRh.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

5.1.1 Local do estudo

O estudo foi realizado na cidade de Fortaleza – Ceará. Localizada no litoral do estado, a cidade apresenta clima tropical com temperatura média anual 27 °C (FUNCEME). De acordo com o IBGE (2010), a cidade de Fortaleza consta de aproximadamente 2,5 milhões de habitantes, sendo que 135.498 na faixa etária de 0-4 anos e 176.363 entre 5-9 anos.

Os pacientes do estudo foram atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), um hospital público, terciário, com atividade de ensino e assistência. O hospital é referência em atendimento pediátrico, atendendo pacientes de todo o estado do Ceará, com uma média de 194 mil atendimentos no último ano, sendo 41.044 consultas na emergência, 153.713 no ambulatório e 7.432 hospitalizações.

5.1.2 Sistema de vigilância

Foram realizadas, no mínimo, coleta de 10 amostras de secreção de nasofaringe por semana epidemiológica de pacientes com infecção respiratória aguda (alta ou baixa) atendidos em enfermarias ou emergência do Hospital Infantil Albert Sabin durante o período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.

5.1.3 População

Foram incluídas no estudo crianças de 0 a 16 anos atendidas pela emergência do Hospital Infantil Albert Sabin. Os pacientes foram diagnosticados com pneumonia pelo médico responsável e apresentavam, além dos sintomas característicos da doença (febre, tosse, cansaço), outros sintomas característicos de infecções respiratórias agudas como coriza, obstrução nasal, espirros, chiado no peito, falta de ar e alterações radiológicas no período máximo de sete dias. A obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE

(Apêndice A) por parte do responsável pela criança também foi considerado um critério de inclusão.

Não participaram desse estudo pacientes acima de 16 anos, atendidos em outros setores do HIAS, sem diagnóstico médico de pneumonia e/ou cujo TCLE não foi obtido.

5.1.4 Tipo de estudo

O estudo caracterizou-se como descritivo, observacional, de corte transversal, realizado em um período de 24 meses consecutivos (2010 e 2011).

5.1.5 Questões éticas

Este estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do HIAS / Registro 070/09 (Anexo 1).

5.2 COLETA DO MATERIAL

5.2.1 Coleta da amostra

As visitas hospitalares para coleta de dados e amostras foram realizadas cinco vezes por semana ou de acordo com a demanda observada durante o período da manhã ou da tarde. O TCLE foi obtido após o responsável ser informado sobre os objetivos do trabalho e procedimento de coleta, permitindo assim que a amostra fosse coletada e os dados clínicos e epidemiológicos fossem acessados.

O espécime clínico utilizado foi a secreção nasofaríngea (SNF) obtida pela técnica de aspiração utilizando uma seringa de 20 mL acoplada a uma sonda de aspiração nº 6. O procedimento foi descrito por Gardner&McQuillin(1974) e é utilizado, desde então, em estudos epidemiológicos de identificação viral em espécime de nasofaringe.

A sonda era introduzida em uma das narinas até altura da nasofaringe onde eram realizados movimentos aspirativos para a obtenção do espécime. As amostras eram

devidamente identificadas e acondicionadas em isopor com barras de gelo reciclável (4 °C) por um período máximo de 4 horas e transportadas ao Laboratório de Virologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal Ceará onde era realizado o processamento.

5.2.2 Coleta dos dados epidemiológicos

O preenchimento da ficha epidemiológica foi realizado em duas etapas. Os dados sociais e demográficos foram coletados através de um questionário padrão aplicado ao responsável pelo paciente e os dados referentes ao exame físico, diagnóstico clínico e tratamento eram obtidos junto ao médico responsável ou através das fichas de atendimento (Apêndice B).

5.3 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

As amostras eram levadas ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Ceará para serem processadas em capela de fluxo laminar NB-2, em um período máximo quatro horas após a coleta. Ao aspirado de nasofaringe obtido eram adicionados 2 mL de meio de manutenção de células, o Meio Essencial Mínimo com sais de Earle (MEM-E) adicionado de penicilina-estreptomicina, glutamina e bicarbonato de sódio. A amostra e o meio eram homogeneizados por movimentos suaves de aspiração e ejeção por uma pipeta Pasteur conectada a uma pera de aspiração com o objetivo de facilitar a liberação das células presentes na amostra. Uma alíquota de 1 mL da amostra diluída acrescida de 1 gota de glicerol foi separada para ser armazenada em freezer a - 86° C para posterior análises por biologia molecular.

O restante da solução era centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante era descartado e o sedimento re-suspendido com tampão salina-fosfato (PBS 10X). A solução obtida era dispensada em lâminas para leitura por IFI. Três lâminas eram preparadas para cada amostra a ser analisada. Uma lâmina era utilizada para triagem e tinha os dois orifícios centrais preenchidos; as demais eram destinadas para determinação do agente em casos positivos na triagem, tendo oito *spots* preenchidos pelo material. A secagem das lâminas era feita na estufa e a fixação era feita

com acetona a 4°C por 10 minutos e então eram submetidas à IFI. Uma lâmina reserva era estocada para casos onde a repetição da IFI se torne necessária.

5.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

De acordo com o Ministério da Saúde (2005) a técnica de Imunofluorescência indireta – IFI vem sendo demonstrada como a mais indicada para a investigação da etiologia viral em casos de IRA. Para a pesquisa qualitativa de VRS_H por IFI foi utilizado o *Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification Kit*, da Chemicon, que utiliza anticorpos monoclonais para a identificação qualitativa de VSR_H, Adenovírus, Parainfluenza 1, 2 e 3 e Influenza A e B.

Em um dos *spots* das lâminas de triagem foram adicionados 8µL de um “pool” de anticorpos monoclonais contra todos os vírus identificados pelo kit. Em um *spot* acima, foi adicionada a mesma quantidade de soro de camundongo normal como controle negativo da reação. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foram lavadas com PBS/Tween e PBS para a retirada do excesso de anticorpos (não ligados aos antígenos da amostra) e submetidas à secagem. O segundo anticorpo, constituído de anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à fluoresceína, foi então adicionado em ambos os *spots* e as lâminas foram submetidas ao mesmo processo da etapa anterior no quesito de incubação e lavagem. Após a secagem, as lâminas foram cobertas com fluido de montagem fornecido pelo kit, montadas com lamínula e observadas ao microscópio de imunofluorescência (Olympus. BX-40). Foram consideradas positivas as amostras que obedeciam ao padrão de fluorescência nas células do epitélio respiratório.

As amostras positivas na etapa de triagem foram submetidas à nova IFI para a identificação específica de vírus respiratórios. Nessa etapa, utilizava-se uma das lâminas específicas correspondentes onde eram adicionados 8µL de anticorpo monoclonal específico para os vírus pesquisados. Foram consideradas positivas para VSR_H as amostras em que as células epiteliais obedeceram aos padrões de fluorescência nuclear e citoplasmática.

5.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PRECEDIDA POR TRANSCRIÇÃO REVERSA DO MATERIAL GENÉTICO VIRAL

As amostras mantidas a -86°C foram submetidas à extração do material genético viral, seguida da reação de transcrição reversa (RT) para posterior amplificação do material genômico por reação em cadeia da polimerase (PCR).

5.5.1 Extração do material genético viral

A extração do material genético viral foi realizada utilizando-se o kit AxyPrep™ Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit” (AXIGEN BIOTECHNOLOGY, Califórnia, USA), conforme as instruções do fabricante. Ao final da extração foram obtidos 50 μL de material de cada amostra. Nesta etapa foi adicionado um inibidor de RNase (RNA OUT da Applied Biosystems) na concentração de 1U/ μL .

5.5.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Utilizou-se o *High Capacity* cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Califórnia, USA) seguindo as instruções do fabricante. A reação foi constituída da mistura de: 2 μL de 10 X RT *buffer* com MgCl_2 a 1,5 mM; 0,8 μL de 25 X dNTP a 100 mM; 2 μL de 10 X RT *Random primers*; 1 μL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase; 3,2 μL de água ultra-pura; e 10 μL do extraído, resultando ao final do processo em 20 μL de produto com cDNA. A programação do termociclador para a reação foi de 25°C por 10 minutos; 37°C por 120 minutos; 85°C por 5 minutos; e a 4°C por tempo indefinido. O produto (cDNA) era armazenado em ultra-freezer a -86°C até o momento do uso.

5.5.3 Reação em cadeia da polimerase

As reações de amplificação foram realizadas separadamente. Os *primers* utilizados para detecção de VSRH foram descritos por Mazzulli *et al.* 1999. As sequências dos *primers* e

o tamanho dos fragmentos e região genômica alvo esperados são apresentados no quadro a seguir:

<i>Primers</i>	Sequência
RSV AB-F1	AACAGTTTAAACATTACCAAGTGA
RSV AB-R	TCATTGACTTGAGATATTGATGC

Fragmento Amplificado: 380 pb
Região genômica: Gene F

Para esta reação foi preparada uma mistura de reagentes contendo: 4,2 μL de água ultra-pura, 0,5 μL de *buffer* com MgCl_2 a 1,5 mM, 0,8 μL de DNTP a 0,2 mM, 1,5 μL de cada *primer* forward e reverse a 10 pMol, 0,5 μL de Taq polimerase a 1U/ μL (BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A) e 4 μL de cDNA. Este processo resulta em 30 μL de material por amostra. A programação do termociclador para esta reação foi de: 94° C por três minutos para desnaturação inicial; 40 ciclos de 94° C por um minuto, 54° C por um minuto e 72° C por um minuto para anelamento e extensão; 72° C por cinco minutos para a extensão final do produto amplificado.

A detecção do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose 1.5% composto por tampão TBE e brometo de etídio. O TBE, que também era usado para a corrida eletroforética era composto de Tris-base (Trihidroximetilaminometano), ácido bórico, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e água destilada. A cada poço do gel era acrescentada 10 μL de amostra e 5 μL de corante, previamente homogeneizados. A corrida durava cerca de 50 minutos a 90V e em seguida era realizada a visualização do gel no transluminador, onde o mesmo era fotografado para posterior análise. Foi considerada positiva a amostra que apresentava o mesmo padrão de bandas do controle positivo.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na comparação entre os métodos de diagnósticos, assim como a positividade entre gêneros, foi utilizado o Teste exato de Fisher. Na comparação dos períodos de ocorrência de casos positivos, entre os anos de estudo, assim como, na comparação das idades entre casos positivos e negativos e na idade entre gêneros, foi utilizado o teste t-Student para amostras independentes. Na análise da comorbidade, assim como na análise dos fatores de risco, foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Pearson. Em todos os testes e análises foi utilizado o nível de significância mínimo de 5% para conclusões afirmativas.

6 RESULTADOS

A amostra constou de 2.013 crianças, sendo 1.119 coletadas no ano de 2010 e 1.030 coletadas no ano de 2011. Dessas, 483 (22.47%) foram diagnosticadas com PAC, sendo 195 (40.37%) em 2010 e 288 (59.63%) em 2011. A prevalência do diagnóstico é maior em crianças de 0 a 12 meses, representando 36.64% do total.

Com relação às características da população de estudo (Tabela 1), o gênero de destaque foi o masculino, totalizando 60.45% do total de crianças atendidas com PAC. Levando em consideração apenas o perfil dos pacientes positivos por RT-PCR, observou-se uma maior quantidade de casos no gênero masculino ($p=0,0000$). Dos pacientes positivos, 84.53% dos tinham até 24 meses de idade, onde os casos positivos prevalecem em pacientes de 0 a 12 meses (51.54%). A proporção masculino/feminino foi de 1.52:1, não constituindo, portanto, diferença significativa ($p=0,4175$).

Quanto à faixa etária, a idade dos pacientes positivos é inferior à idade dos pacientes negativos ($p=0,0000$). Não houve diferença significativa, na idade dos pacientes positivos, entre os gêneros masculino e feminino ($p=0,8617$).

Com relação ao destino a maioria dos pacientes, tanto VSRh positivo (76%) quanto VSRh negativo (71%) receberam alta. As hospitalizações ($p= 0.3228$) e transferências (0.4389) parecem não ter relação com a positividade.

Tabela 1. Características da população de estudo positiva e negativa para VSRh nos anos de 2010 e 2011.

Característica	VSRh positivo	VSRh negativo	Total	Odds ratio IC 95%	p-valor
Sexo					
Masculino	55	237	292	1.3281 (0.8514– 2.0719)	0.2102
Feminino	45	146	191	0.7529 (0.4827- 1.1746)	0.2102
Total	100	383	483	--	0.4175
Faixa etária					
0-12	50	126	176	2.0397 (1.3055 - 3.1867)	0.0015
13-24	34	137	171	0.9250 (0.5819 - 1.4705)	0.7416
25-36	8	48	56	0.6069 (0.2773 - 1.3282)	0.2074
37-48	6	28	34	0.8093 (0.3256 - 2.0117)	0.6482
49-60	1	13	14	0.2875 (0.0372 - 2.2244)	0.2037
+ de 60	1	31	32	0.1147 (0.155 - 0.8507)	0.0110
Total	100	383	483	-	-
Destino					
Alta	76	272	348	1.2923 (0.7766 - 2.1504)	0.3228
Internação	4	30	34	0.4903 (0.1686 - 1.4256)	0.1821
Já hospitalizado	8	45	53	0.6531 (0.2974 - 1.4342)	0.2854
Transferência	12	36	48	1.3244 (0.6567 - 2.6309)	0.4389
Total	100	383	483	-	-

Fonte: O Autor

Quanto à presença de comorbidades (Tabela 2), observou-se que a mesma acontece, proporcionalmente, entre os casos negativos (79.53%). A maioria dos pacientes com PAC positivos para VSRH não apresentavam nenhum tipo de comorbidade (90.72%). Entre aqueles que apresentavam, destacam-se a imunossupressão e a asma.

Dentre os fatores de risco apresentados por pacientes positivos para VSRh (Tabela 3) destaca-se a presença de familiares com IRA (41 casos/42.26%). Aproximadamente 32% (31 casos) não apresentaram fatores de risco. A prematuridade também se destaca dentre os fatores de risco, que é tão presente entre os casos negativos quanto nos casos positivos, sendo os demais fatores mais presentes entre os casos negativos ($p=0,0138$).

Tabela 2: Comorbidades relacionadas a pacientes apresentando pneumonias VSRh(+) e VSRh (-) nos anos de estudo.

	VSRh (+)	VSRh (-)	Total	Odds ratio IC 95%	p-valor
Comorbidade					
Nenhuma	307	86	393	0.4971 (0.2532 - 0.9758)	0.0390
Cardiopatía	12	21	14	0.1161 (0.0548 - 0.2461)	0.0000
Pneumopatia crônica	4	1	5	1.0052 (0.1111 - 9.0972)	0.9962
Doença neurológica	8	1	9	2.0317 (0.2511 - 16.4417)	0.4976
Imunossupressão	35	4	39	2.3184 (0.8037 - 6.6879)	0.1101
Asma	8	3	11	0.6631 (0.1726 - 2.5478)	0.5470
Refluxo gastroesofágico	1	0	1	N/A	0.6157
Cardiopatía + Refluxo gastroesofágico	1	0	1	N/A	0.6158
Pneumopatia crônica + Doença neurológica	1	0	1	N/A	0.6159
Doença neurológica + Asma	2	0	2	N/A	0.4774
Doença neurológica + Refluxo gastroesofágico	2	0	2	N/A	0.4775
Asma + Refluxo gastroesofágico	2	0	2	N/A	0.4776
Cardiopatía + Refluxo gastroesofágico + Asma	1	0	1	N/A	0.6159
Pneumopatia crônica + Doença neurológica + Refluxo gastroesofágico	1	0	1	N/A	0.6160
Cardiopatía + Penumopatia crônica + Doença Neurológica + Refluxo gastroesofágico	1	0	1	N/A	0.6161
Total	386	97	483	-	-

Fonte: O Autor. N/A: Não aplicável - Intervalo de confiança não estabelecido.

Tabela 3: Presença ou ausência de fatores de risco apresentados por pacientes com pneumonia VSRh(+) ou VSRh (-) nos anos de estudo.

	VSRh (+)	VSRh (-)	Total	Odds ratio IC 95%	p-valor
Fatores de risco					
Ausência de fatores	32	134	166	0.8745 (0.5476 – 1.3987)	0.5754
Familiar com IRA	42	144	186	1.2290 (0.7852 - 19.236)	0.3665
Contato com Fumante	4	21	25	0.7183 (0.2408 - 2.1420)	0.5511
Não amamentado	5	11	16	1.7799 (0.6039 - 5.2459)	0.2896
Prematuridade	5	0	5	N/A	0.0000
Familiar com IRA + Contato com fumante	6	25	31	0.9140 (0.3644 - 2.2925)	0.8480
Familiar com IRA + Não amamentado	2	11	13	0.6920 (0.1509 - 3.1736)	0.6338
Familiar com IRA + Prematuridade	2	7	9	1.0962 (0.2242 - 5.3602)	0.9096
Contato com Fumante + Não amamentado	0	6	6	N/A	0.2078
Não amamentado + Prematuridade	1	1	2	3.8586 (0.2392 - 62.2376)	0.3055
Familiar com IRA + Contato com fumante + Não amamentado	0	1	1	N/A	0.6089
Familiar com IRA + Contato com fumante + Prematuridade	1	2	3	1.9242 (0.1727 - 21.4386)	0.5881
Familiar com IRA + Não amamentado + Prematuridade	1	3	4	1.2695 (0.1317 - 12.4340)	0.8313
Familiar com IRA + Contato com fumante + Não amamentado + Prematuridade	0	1	1	N/A	0.6089
Total	100	383	483		

Fonte: O Autor

Das 483 amostras identificadas como PAC, 55 (11.38%) foram positivas para VSRh pela técnica de IFI e 97 (20.08%) pela técnica de RT-PCR (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação dos resultados positivos e negativos para VSRh entre os métodos IFI e RT-PCR.

IFI	RT-PCR		Total	κ	p-valor
	Positivo	Negativo			
Positivo	52	3	55	--	--
Negativo	45	383	428	--	--
Total	97	386	483	0.631	0.001

Fonte: O Autor

Dos casos positivos detectados por RT-PCT, 53,60% (52) são detectados também por intermédio da IFI. Três casos(0,77%) negativos detectados por intermédio do RT-PCT são apresentados como positivos por intermédio da IFI. Observou-se que a técnica de RT-

PCR aumenta significativamente o total de amostras positivas para VSRh, quando comparado com a técnica de IFI ($p=0,0001$), perfazendo um total de 43.30% a mais de amostras positivas.

Quando comparada com a RT-PCR, teste aqui intitulado padrão-ouro para a detecção de VSRh, a IFI apresentou sensibilidade e especificidade de aproximadamente 53.69% e 99.22%, respectivamente. Houve boa concordância entre os métodos ($\kappa = 0.6304$). O valor preditivo positivo girou em torno de 94.54% e o valor preditivo negativo de 89.48%.

No que diz respeito à sazonalidade, observou-se que a prevalência do VSRh não seguiu o mesmo padrão quando comparados os anos de 2010 e 2011 (Gráfico 1). Os casos positivos de 2011 aconteceram principalmente nos meses de março e abril, três meses antes aos casos positivos de 2010, que aconteceram principalmente entre os meses de maio e agosto ($p=0,0000$).

Ao fazer a correlação entre o índice pluviométrico mensal dos anos do estudo e a positividade do VSRh pelas técnicas de RT-PCR e IFI, observou-se que o aumento da detecção do vírus esteve relacionado com a estação chuvosa, embora os picos de VSRh não tenham coincidido com o pico de chuva do ano correspondente. Verificou-se também que a positividade entre as duas técnicas apresentou picos em meses distintos e diferente período de extensão.

No ano de 2010, o pico de positividade por VSRh para ambas as técnicas aconteceu em junho, embora a maior pluviosidade tenha sido encontrada no mês de abril do mesmo ano. O período epidêmico detectado por IFI durou cerca de cinco meses, abril a agosto, um mês a menos que o período detectado por RT-PCR, que se estendeu até setembro.

No ano de 2011 ocorreram dois picos pluviométricos, um em janeiro e outro em abril. A maior detecção de casos positivos para VSRh por IFI ocorreu em março com tendência decrescente no mês seguinte. Já por RT – PCR, o pico que começou em março teve o ápice no mês de abril, coincidindo com o pico de pluviosidade do trimestre e contrastando com a tendência de crescimento dos resultados por IFI. Ainda referente ao ano de 2011, constatou-se que a extensão do período epidêmico detectado por ambas as técnicas foi semelhante.

Figura 4: Distribuição mensal do volume de chuvas, casos de pneumonias totais e positivas para VSRh nos anos de 2010 e 2011.

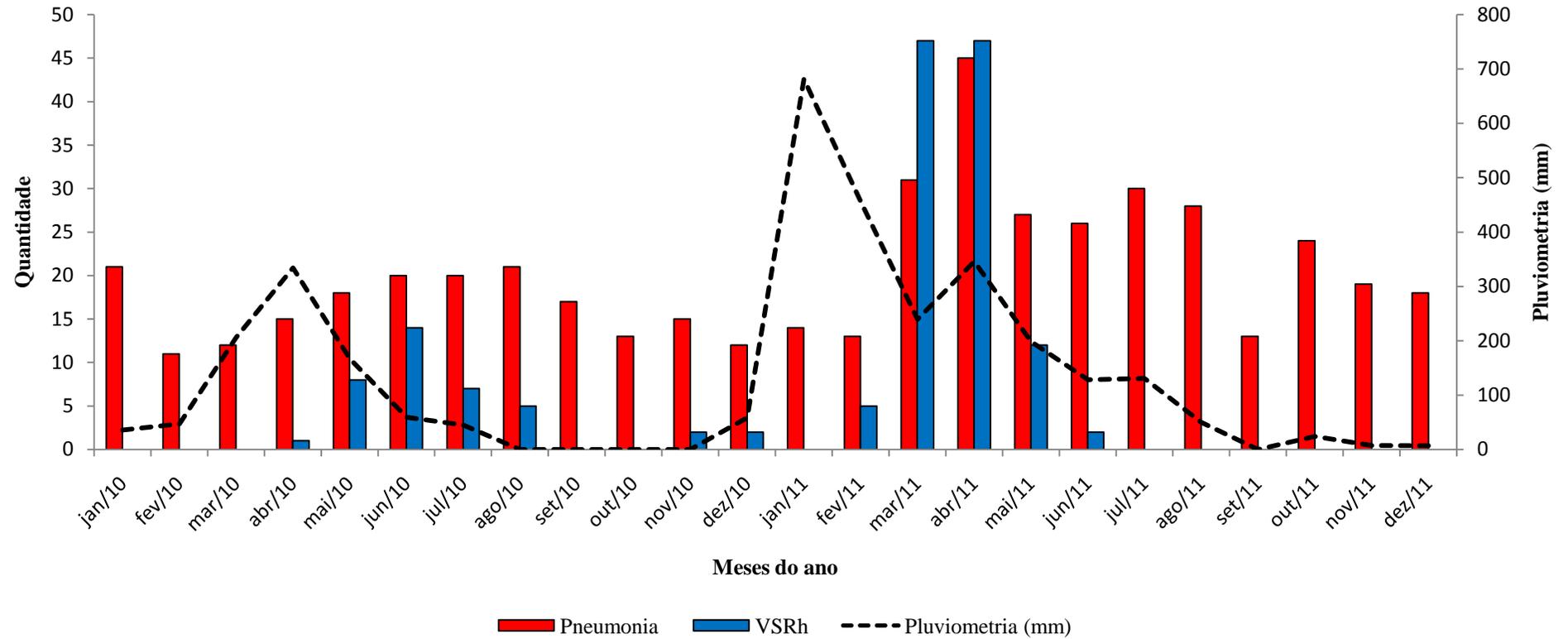
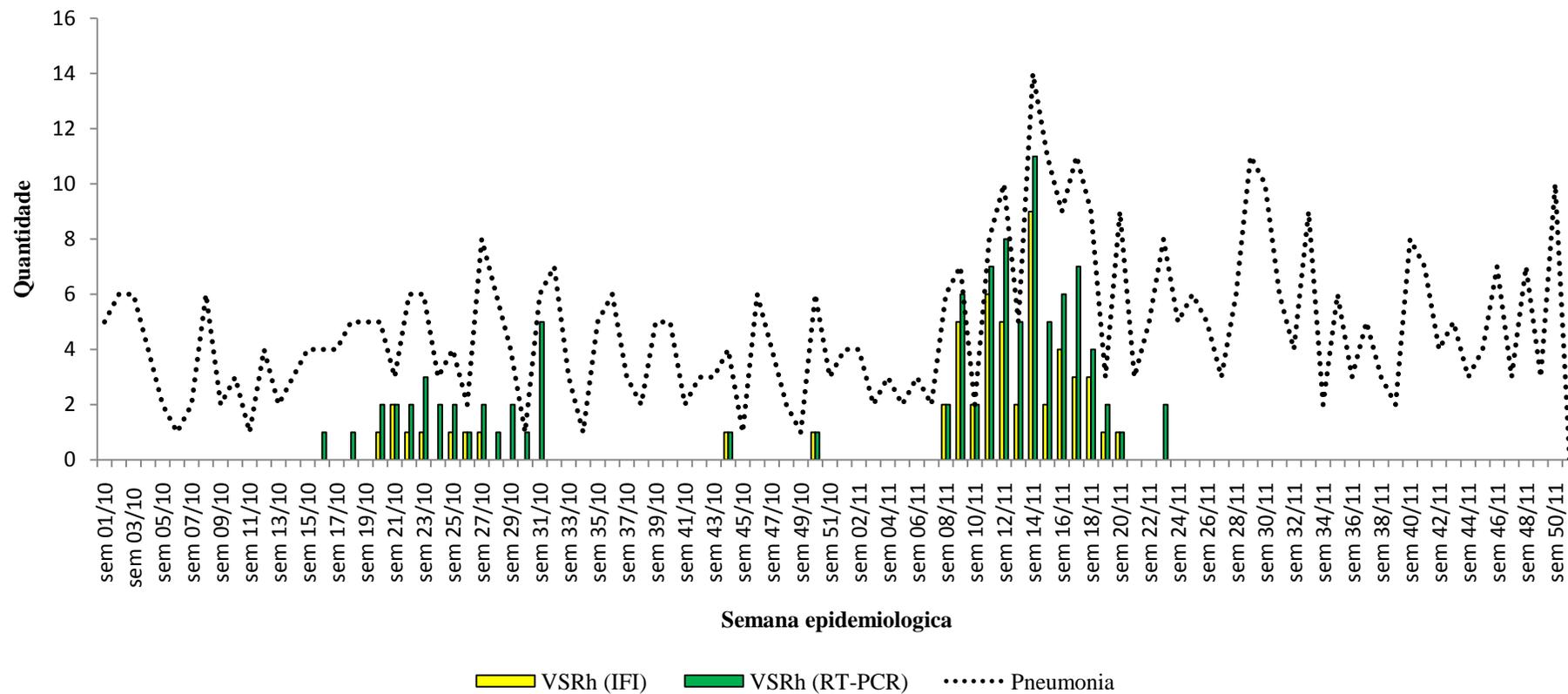


Figura 5: Distribuição semanal dos casos de pneumonia totais e positivas para VSRh por IFI e RT-PCR nos anos de 2010 e 2011.



7 DISCUSSÃO

As IRAs são um conjunto de síndromes respiratórias que estão relacionadas com alta taxa de morbidade e mortalidade infantil (RODRIGUES et al., 2011; TANEJA, et al., 2009). Dentre elas, destaca-se a PAC por representar a principal causa de óbito por doenças infecciosas em crianças abaixo dos 5 anos de idade (CHAUVET et al., 2010; LEAL et al., 2012). Por essa razão, medidas de saúde pública foram instituídas a fim de prevenir, controlar e minimizar os impactos causados por estas infecções (UNICEF, 2013; WHO, 2013). Embora a taxa de mortalidade por PAC no Brasil tenha reduzido de forma significativa, o número de hospitalizações e taxa de mortalidade por PAC tem aumentado, provavelmente em virtude do aparecimento de casos mais graves da doença (CAUVET et al., 2010; UNICEF, 2013).

O VSRh, além de ser apontado como a principal causa das IRAs virais, é o principal agente viral causador de PAC (CONTERNO et al., 2011; DONALISIO et al., 2011; ROCHA NETO et al., 2013). O VSRh tem sido o vírus mais frequentemente detectado em casos de infecções respiratórias baixas, especialmente pneumonias, em estudos realizados com crianças de Fortaleza. Em 2010, no entanto, o VSRh foi detectado em apenas 10 de 195 casos de pneumonias, contrastando com o número bem superior de detecção relatado em anos anteriores. Embora em muitos países a ocorrência dos períodos epidêmicos de VSRh seja regular pode haver variações no número de detecções do agente, ocorrendo períodos epidêmicos onde o número de detecções deste vírus é bem inferior ao de outros.

A escolha adequada do espécime clínico e o correto diagnóstico da PAC viral são imprescindíveis para a instituição do tratamento correto e manejo do paciente, armazenamento dos dados epidemiológicos e elaboração de programas de controle e prevenção da infecção (LEAL et al., 2012; ROCHA NETO et al., 2013). Nesse estudo, o aspirado de nasofaringe foi escolhido por permitir um aumento significativo na detecção de vírus respiratórios, independente da técnica utilizada, além de ser uma técnica menos traumática na obtenção do espécime clínico quando comparada às demais. O diagnóstico laboratorial viral foi realizado através de duas técnicas: IFI e RT-PCR.

A IF e suas variações apresentam sensibilidade e especificidade semelhantes à cultura de células e sensibilidade superior ao teste de ELISA (TRISTAM & WELLIVER, 1995), além de serem consideradas “padrão-ouro” na detecção rápida do VSRH (SALOMÓN et

al.,1989). Um estudo realizado por Takimoto e colaboradores (1991) afirmou que a imunofluorescência é confiável para o diagnóstico VSRh, sendo comparável ao isolamento viral por ter apresentado sensibilidade, especificidade e concordância de 100%, 93% e 93.6 % respectivamente.

Para a técnica IFI utilizou-se o *Respiratory Panel 1 Viral Screening and Identification Kit* da Chemicon, que apresenta sensibilidade e especificidade de 89% e 92% respectivamente. A principal vantagem do *kit* é a possibilidade da triagem de casos positivos para sete vírus em um curto período de tempo, cerca de duas horas. A observação de fluorescência inespecífica em uma pequena porcentagem de lâminas (4% a 10%) é considerada a principal desvantagem da técnica, entretanto, o fato pode ser revertido através da leitura de lâminas por um microscopista experiente.

As técnicas moleculares vêm sendo utilizadas na rotina diagnóstica de diversos agentes, incluindo os causadores de IRAs. A RT-PCR vem surgindo como técnica complementar para o diagnóstico do VSRh, já que apresenta sensibilidade e especificidade superiores à IF. Em um estudo realizado por Freymuth e colaboradores (1995) observou-se que a sensibilidade e especificidade de RT-PCR comparado à cultura foi de 97,5 % e 63,9 %, respectivamente; observou-se também que RT-PCR apresentou sensibilidade maior que IF e isolamento viral.

Para a técnica de RT-PCR foi utilizado o *kit* AxyPrep™ Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit” (AXIGEN BIOTECHNOLOGY, Califórnia, USA) para a extração do material genético viral, o *High Capacity* cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Califórnia, USA) para a reação da transcrição reversa e os insumos da BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. para a reação de PCR.

A IFI tem sido a técnica utilizada na pesquisa de VSRh e outros vírus respiratórios em estudos realizados em Fortaleza desde 2001, devido à sensibilidade e especificidade na detecção deste vírus. Apesar da menor sensibilidade da IFI em relação aos de métodos de biologia molecular, seu emprego não deve ser abolido uma vez que a IFI é uma técnica em que vários vírus podem ser pesquisados simultaneamente, além de apresentar menor custo e rápida execução, possibilitando que o resultado do teste esteja disponível para o médico em poucas horas. Além disso, a técnica de IFI tem sido utilizada por diversos sistemas de vigilância vírus respiratórios de vários países, incluindo o Brasil. No entanto, a utilização da

RT-PCR, um método reconhecido pela sua sensibilidade superior a da IFI, possibilitou a detecção de mais 42 casos VSRH positivos não detectados pela IFI.

A detecção do antígeno viral por anticorpos monoclonais disponíveis em *kits* comerciais é, sem dúvida, a técnica mais rentável e rápida disponível para o diagnóstico de VSRH, mas o desempenho da técnica RT-PCR mostrou-se superior na detecção de alguns casos de VSRH. Durante o período de estudo, o VSRH foi encontrado em 11.38% dos casos de PAC positivas quando diagnosticados por IFI e em 20.08% quando identificado por RT-PCR. Mesmo com uma notável diferença entre o percentual de identificação pelas técnicas, a prevalência por ambas está de acordo com a encontrada em outros países e em estudos no Brasil.

Na comparação entre RT-PCR e IFI foi encontrada sensibilidade de 94.54%, ou seja, a técnica detectou que a maioria dos resultados corresponde a indivíduos verdadeiramente positivos. Quanto à especificidade, que é a capacidade que o teste diagnóstico tem de detectar os verdadeiros negativos, o valor encontrado foi de 89.48%. O indicador *Kappa* apontou concordância de 62.82% entre os testes. O valor preditivo positivo, que representa a proporção de doentes entre os positivos pelo teste, foi de 53.60%; já o valor preditivo negativo, proporção de indivíduos sem infecção entre os negativos ao teste, foi de 99.22% semelhantes aos encontrados na literatura. Esse percentual está de acordo com o encontrado em outros trabalhos comparativos (FREYMUTH *et al.*, 1995; OSIOWY, 1995) e implica dizer que a RT-PCR é um método confiável na detecção de VSRh por causa da sua sensibilidade, especificidade e concordância quando comparado com outros considerados “padrão-ouro”, como a IFI.

A variação da sequência de RNA entre cepas de VSRh foi cogitada para explicar a presença de resultados falso-negativos, entretanto o fato parece ser improvável uma vez que na região alvo do gene F as sequências iniciadoras são idênticas para ambos os subtipos A e B de VSRh. A explicação mais provável para o fato de três amostras terem sido positivas por IFI e negativas por RT-PCR, no entanto, é que as amostras apresentaram títulos de partículas virais abaixo do limiar de sensibilidade de RT - PCR, que é cerca de 10 TCID₅₀S ou que a integridade do RNA tenha sido afetada pelo congelamento/descongelamento das amostras.

Em 2010 o período epidêmico por IFI durou quatro meses teve início no fim de abril e se estendeu até agosto; entretanto, por RT-PCR o pico durou cinco meses, se estendendo até setembro. Por ambas as técnicas a maior detecção do vírus ocorreu em junho do mesmo ano.

Em 2011 o pico de VSRh por ambas as técnicas durou cinco meses, de fevereiro a julho, havendo divergência no período de maior detecção viral; por IFI, o pico foi em março e por RT-PCR, em abril. A ocorrência dos períodos epidêmicos de VSRh em Fortaleza está relacionada à estação chuvosa e como 2010 foi um ano de baixo volume de chuvas quando comparado ao ano de 2011, com o registro de apenas 38,5% do volume de chuvas registrado em 2011, pode-se sugerir que esse tenha sido um fator adicional a influenciar na baixa detecção do vírus. Apesar da detecção superior de VSRh alcançada pelo uso da RT-PCR, notou-se que em 2010 houve de fato uma circulação menor do vírus, com a detecção de 42,64% dos encontrados em 2011.

A ocorrência de PACs por VSRh apresentou um padrão sazonal semelhante ao de outros estudos realizados na cidade de Fortaleza (ALONSO et al., 2012; MOURA et al., 2013, 2006), na região nordeste do país (BEZERRA et al., 2011; MELO & SILVA, 1992; MOURA et al., 2003) onde, de modo geral, os períodos epidêmicos tiveram início no primeiro semestre e duração em torno de cinco meses. Em áreas tropicais o surto do VSRh normalmente varia com o período de chuvas e ocorre geralmente dois meses após o início da estação chuvosa. Essa correlação foi observada por Moura e colaboradores (2013) que ressaltou a correlação entre o aumento da detecção do vírus com a estação chuvosa, embora os picos de VSRh não tenham coincidido com o pico de chuva do ano correspondente; a mesma característica foi observada nesse estudo.

Em relação ao sexo, não houve diferença significativa entre os gêneros masculino e feminino dentre os casos positivos de PAC. Embora muitos trabalhos relatem a maior ocorrência dos casos positivos em pacientes do sexo masculino, a maioria dos autores afirma não haver diferença significativa quando comparados aos casos positivos em pacientes femininos (ALONSO et al., 2012; MOURA et al., 2013, 2006; THOMAZELLI et al., 2007).

No quesito idade, observou-se correlação entre positividade e idade do paciente, onde a maior prevalência de casos positivos por VSRh relacionada à menor idade dos pacientes. Esta característica está de acordo com o encontrado em estudos no Brasil e no mundo (ALONSO et al., 2012; BEZERRA et al., 2012; MOURA et al., 2013, 2006; OHUMA et al., 2012), onde a maior prevalência é encontrada em crianças nos primeiros anos de vida, principalmente abaixo dos seis meses de idade.

A maioria dos pacientes que apresentaram PAC positiva para o VSRh não apresentaram qualquer tipo de comorbidade. Entre aqueles que apresentavam, 11,34%

(11/97), destacam-se a presença de imunossupressão e asma, concordante com os VSRh relatados na literatura (COLLINS & GRAHAM, 2008; EL SALLEBY et al., 2011; VAN BLEEK et al., 2011). Casos de IRAs graves em imunocomprometidos são relativos à persistente replicação viral nos pulmões desses pacientes. Já em pacientes com quadro asmático, a infecção pode se potencializar (WELLIVER et al., 2003).

Quanto aos fatores de risco, a prematuridade apresentou destaque tanto entre os pacientes positivos quanto entre os pacientes negativos. A prematuridade, associada ou não a comorbidades ou outros fatores de risco, é apontada como forte fator de agravamento para doença grave por VSRh (WELLIVER, 2003). Crianças pré-termo possuem uma chance maior de desenvolver complicações graves após infecção por VSRh e evoluir a óbito do que crianças a termo. Os principais fatores que contribuem para esse fato são a imaturidade pulmonar e do sistema imune e interrupção prematura da exposição aos anticorpos da mãe (CARBONELL, 2008).

Dentre aqueles pacientes com PAC positivos para VSRh, houve destaque para a presença de familiares com IRA, associada ou não a outros fatores de risco como contato com fumante, prematuridade e não amamentação. Essa correlação já foi relatada por outros trabalhos ao redor do mundo (LESSLER et al., 2009; PAPENBURG et al., 2012; VAN BLEEK et al., 2011). A exposição ao fumo antes e após o nascimento é listado como um dos fatores de risco que mais contribui para a gravidade da infecção por VSRh (BRADLEY et al., 2005; GROSKREUTZ et al., 2009).

Foi demonstrado nesse trabalho a importância do VSRh como agente causador de IRAs, especialmente as PACs, em crianças nos primeiros anos de vida. Verificou-se, ainda, que apesar da regularidade na ocorrência dos períodos epidêmicos de VSRh em Fortaleza, variações na extensão e intensidade dos mesmos são comuns. A ocorrência de períodos epidêmicos com baixa detecção de VSRh pode ser relacionada tanto a fatores relacionados aos próprios vírus circulantes como externos a eles.

8 CONCLUSÕES

- ✓ A técnica de RT-PCR mostrou-se mais sensível na detecção de casos de PAC por VSRh quando comparada à IFI, possibilitando uma melhor identificação do agente viral e permitindo uma melhor caracterização da extensão dos períodos epidêmicos do VSRh.
- ✓ Não houve mudança no padrão sazonal, definido anteriormente por IFI, na detecção do VSRh quando utilizada a técnica RT-PCR.
- ✓ A escolha de um método diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade é crucial para a implementação de medidas profiláticas como a administração do palivizumabe e adequação do calendário vacinal à realidade da região.
- ✓ Através dos resultados encontrados pode-se sugerir a gradual implantação de técnicas de biologia molecular na rotina de um laboratório de virologia diagnóstica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, W.J.; LARANJEIRA, B.J.; PEREIRA, S.A.; et al. Comparative dynamics, morbidity and mortality burden of pediatric viral respiratory infections in an equatorial city. **The Pediatric infectious disease journal**. v. 31, n. 1, p. 9-14, 2012.
- AMBROSIONI, J.; BRIDEVAUX, P. O.; WAGNER, G.; et al. Epidemiology of viral respiratory infections in a tertiary care centre in the era of molecular diagnosis, Geneva, Switzerland, 2011-2012. **Clinical Microbiology Infection**. v.20, n. 9, p. 578-84, 2014.
- AMORIM, P. G.; MORCILLO, A. M.; TRESOLDI, A. T.; et al. Factors associated with complications of community-acquired pneumonia in preschool children. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 38, n.5, p. 614-621, 2012.
- ANDERSON, L. J.; HIERHOLZER, J. C.; TSOU, C.; et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n. 4, p. 626-633, 1985.
- ARRUDA, E.; JONES, M. H.; ESCREMIM DE PAULA, F.; et al. The burden of single virus and viral coinfections on severe lower respiratory tract infections among preterm infants: a prospective birth cohort study in Brazil. **Pediatric Infections Disease Journal**.v. 33, n. 10, p. 997-1003, 2014.
- BAEK, Y.H.; CHOI, E.H.; MIN-SUK, S.; et al. Prevalence and genetic characterization of respiratory syncytial virus (RSV) in hospitalized children in Korea. **Archives of virology**, v. 157, n. 6, p. 1039-1050, 2012.
- BARBOSA-RAMIREZ, J.; PULIDO DOMINGUEZ, P.; REY BENITO, G.; et al. Human respiratory syncytial virus and metapneumovirus in patients with acute respiratory infection in Colombia, 2000-2011. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 36, n. 2, p. 101-109, 2014.
- BARDACH, A.; REY-ARES, L.; CAFFERATA, M. L.; et al. Systematic review and meta-analysis of respiratory syncytial virus infection epidemiology in Latin America. **Reviews in medical virology**, v. 24, n. 2, p. 76-89, 2014.
- BAKIK, S.; BITKO, V. Prospects of RNA interference therapy in respiratory viral diseases: update 2006. **Expert opinion on biological therapy**. v. 6, n. 11, p. 1151-60, 2006.
- BARRA, G. B.; CAIXETA, M. C. S. A. S. B.; COSTA, P. G. G.; et al. Diagnóstico molecular – passado, presente e futuro Molecular diagnosis – past, present and future. **RBCA**. v. 43, n. 3, p.254-60, 2011.
- BELDERBOS, M.E.; HOUBEN, M. L.; WILBRINK, B.; LENTJES, E.; BLOEMEN, E. M.; KIMPEN, J.L.; ROVERS, M.; BONT, L. Cord blood vitamin D deficiency is associated with respiratory syncytial virus bronchiolitis. **Pediatrics**. v. 127, n, 6, p. 1513-20, 2011.
- BEZERRA, P. G. M.;DUARTE, M. C. M. B.;BRITTO, M. C. A.;CORREIA, J. B. Gravidade das coinfeções virais em lactentes hospitalizados com infecção por vírus sincicial respiratório. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**. v. 87, n. 5, 2011.
- BREALEY, J. C.; MACKAY, I. M.; BLETCHLY, C.; et al. Respiratory syncytial virus infection is associated with increased bacterial load in the upper respiratory tract in young children. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, n. 1, p. 1, 2013.
- CALADO, C.; NUNES, P.; PEREIRA, L.; et al. Are there any differences in the community acquired pneumonias admitted to hospital over the past decade? **Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)**. v. 16, n. 2, p. 287-305, 2010.
- CANDEIAS, J. A. N. Isolamento de vírus respiratório sincicial em crianças com quadros respiratórios agudos. **Revista Instituto de Medicina Tropical**. v.7, n. 2, p. 27-30, 1967.

- CANE, P. A.; MATTHEWS, D. A.; PRINGLE, C. R. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. **The Journal of general virology**. v. 72, n. 9, p. 2091-6, 1991.
- CANTAIS, A.; MORY, O.; PILLET, S., Epidemiology and microbiological investigations of community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a university hospital. **Journal of Clinical Virology**, v. 60, n. 4, p. 402-407, 2014.
- CARBONELL-ESTRANY, X.; QUERO, J. Hospitalization rates for respiratory syncytial virus infection in premature infants born during two consecutive seasons. **The Pediatric infectious disease journal**. v. 20, n. 9, p. 874-9, 2001.
- CHANOCK, R. M.; FINBERG, L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. epidemiological aspects of infection in infants and young children. **American Journal of Epidemiology**. v. 66, n. 3, p. 291-300, 1957.
- CHANOCK, R. M.; ROIZMAN, B.; MYERS, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. I. Isolation, properties and characterization. **American Journal of Hygiene**. v. 66, n. 3, p. 281-290, 1957.
- CHAUVET, P.; COSTA, W.; FARIA, A. C. Pneumonia Adquirida na Comunidade. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. v. 17, n. 23, p. 17-9, 2010.
- CHENG, X.; PARK, H.; ZHOU, H.; JIN, H. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. **Journal of virology**. v. 79, n. 22, p. 13943-52, 2005.
- CHOUDHARY, M. L.; ANAND, S. P.; WADHWA, B. S. & CHADHA, M. S. Genetic variability of human respiratory syncytial virus in Pune, Western India. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p. 369-377, 2013.
- COATES, H. V.; ALLING, D. W.; CHANOCK, R. M. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test. **American journal of epidemiology**. v. 83, n. 2, p. 299-313, 1966.
- COATES, H. V.; KENDRICK, L.; CHANOCK, R. M. Antigenic differences between two strains of respiratory syncytial virus. In **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. Society for Experimental Biology and Medicine, New York, NY, v. 112, n. 4, p. 958-964, 1963.
- COLLINS, P. L.; CHANOCK, R. M.; MURPHY, B. R. Respiratory syncytial virus. **Fields virology**. v. 1, n. 45, p. 1443-85, 2007.
- COLLINS, P. L.; GRAHAM, B. S. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. **Journal of virology**. v. 82, n. 5, p. 2040-55, 2008.
- COLLINS, P. L.; HILL, M. G.; CRISTINA, J.; GROSFELD, H. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 93, n. 1, p. 81-85, 1996.
- COLLINS, P. L.; MELERO, J. A. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. **Virus research**. v. 162, n. 1, p. 80-99, 2011.
- CONTERNO, L. O.; MORAES, F. Y. D.; SILVA FILHO, C. R. D. Implementation of community-acquired pneumonia guidelines at a public hospital in Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 37, n. 2, p.152-9, 2011.
- CORRÊA, R. A.; LUNDGREN, F. L. C.; PEREIRA-SILVA, J. L.; et al. Diretrizes brasileiras para pneumonia adquirida na comunidade em adultos imunocompetentes-2009; Brazilian guidelines for community-acquired pneumonia in immunocompetent adults-2009. **Jornal brasileiro de pneumologia**. v. 35, n. 6, p. 574-601, 2009.
- COWTON, V. M.; MCGIVERN, D. R.; FEARN, R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. **Journal of general virology**. v. 87, n. 7, p. 1805-21, 2006.

- CUI, G.; ZHU, R.; QIAN, Y.; et al. Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups a and B in children in recent five consecutive years. **PLoS One**. v. 8, n. 9, p. 75-80, 2013.
- DALLONDER, J.; LOPES, C. L. S.; SECHI, F. L.; SANDER, M. B. & ECKERT, G. U. Perfil dos pacientes internados por bronquiolite viral aguda em uma Unidade de Terapia Intensiva em hospital infantil do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**, v. 58, n. 2, p. 130-134, 2014.
- D'ELIA, C.; SIQUEIRA, M. M.; PORTES, S. A.; SANT'ANNA, C. C. Respiratory syncytial virus — associated lower respiratory tract infections in hospitalized infants. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, n. 1, 2005.
- DONALISIO, M. R.; ARCA, C. H. M.; MADUREIRA, P. R. D. Clinical, epidemiological, and etiological profile of inpatients with community-acquired pneumonia at a general hospital in the Sumaré microregion of Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 37, n. 2, p. 200-8, 2011.
- DUCOFFRE, G.; CAUCHI, P.; HENDRICKX, E. Respiratory Syncytial virus epidemiology in Belgium in 1998, 1999 y 2000. **J Perinat Med**. v. 29, n. 2, p. 352, 2001.
- EL SALEEBY, C. M.; BUSH, A. J.; HARRISON, L. M.; et al. Respiratory syncytial virus load, viral dynamics, and disease severity in previously healthy naturally infected children. **Journal of Infectious Diseases**. v. 204, n. 7, p. 996-1002, 2011.
- FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. Respiratory syncytial virus infection in adults. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 13, n. 3, p. 371-384, 2000.
- FELTES, T. F.; SONDHEIMER, H. M. Palivizumab and the prevention of respiratory syncytial virus illness in pediatric patients with congenital heart disease. **Expert opinion on biological therapy**. v. 7, n. 9, 1471-80, 2007
- FENG, L.; LAI, S.; LI, F.; et al. Viral etiologies of hospitalized pneumonia patients aged less than five years in six provinces, 2009-2012. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**. v. 35, n. 6, p. 646-9, 2014.
- FREITAS, F.T.M. Sentinel surveillance of influenza and other respiratory viruses, Brazil, 2000–2010. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 62-68, 2013.
- FREYMUTH, F.; EUGENE, G.; VABRET, A.; et al. Detection of respiratory syncytial virus by reverse transcription-PCR and hybridization with a DNA enzyme immunoassay. **Journal of clinical microbiology**. v. 33, n. 12, p. 3352-5, 1995.
- FUENTES, S.; TRAN, K. C.; LUTHRA, P.; TENG, M. N.; HE, B. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. **Journal of virology**. v. 81, n. 15, p. 8361-6, 2007.
- FUNCEME - Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. Disponível em ><http://www.funceme.br/>< Acesso dia 15/11/2013 às 15:45 hrs.
- GARDNER, P. S.; MCQUILUN, J. Rapid virus diagnosis. Application of immunofluorescence. Butterworth & Co. (Publishers) Ltd, 88 Kingsway, London WC2B 6AB. 1974
- GHILDYAL, R.; MILLS, J.; MURRAY, M.; et al. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. **Journal of general virology**. v. 83, n. 4, p. 753-757, 2002.
- GIMFERRER, L.; GIMFERRER, L.; CAMPINS, M.; et al. Molecular epidemiology and molecular characterization of respiratory syncytial viruses at a tertiary care university hospital in Catalonia (Spain) during the 2013–2014 season. **Journal of Clinical Virology**, v. 66, p. 27-32, 2015.
- GORSKI, S. A.; HUFFORD, M. M.; BRACIALE, T. J. Recent insights into pulmonary repair following virus-induced inflammation of the respiratory tract. **Current opinion in virology**. v. 2, n. 3, p. 233-41, 2012.
- GRAHAM, B. S. Biological challenges and technological opportunities for respiratory syncytial virus vaccine development. **Immunological reviews**. v. 239, n. 1, p. 149-166, 2011.

- GREENBERG, H. B.; PIEDRA, P. A. Immunization against viral respiratory disease: a review. **The Pediatric infectious disease journal**. v. 23, n. 11, p. 254-61, 2004.
- GROSKREUTZ, D. J.; MONICK, M. M.; BABOR, E. C.; et al. Cigarette smoke alters respiratory syncytial virus-induced apoptosis and replication. **American journal of respiratory cell and molecular biology**. v. 41, n. 2, p. 189, 2009.
- HALL, C. B.; WALSH, E. E.; LONG, C. E.; SCHNABEL, K. C. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. **Journal of Infectious Diseases**. v. 163, n. 4, p. 693-8, 1991.
- HAYNES, A. K.; PRILL, M. M.; IWANE, M. K.; GERBER, S. I. Respiratory syncytial virus--United States. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**. v. 63, n. 48, p. 1133-6, 2014.
- HENRICKSON, K. J.; HALL, C. B. Diagnostic assays for respiratory syncytial virus disease. **The Pediatric infectious disease journal**. v. 26, n. 11, p. 36-40, 2007.
- HIRSH, S.; HINDIYEH, M.; KOLET, L.; et al. Epidemiological changes of respiratory syncytial virus (RSV) infections in Israel. **PLoS one**, v. 9, n. 3, p. e90515, 2014.
- HSU, C.H.; LIN, C. Y.; CHI, H.; et al. Prolonged seasonality of respiratory syncytial virus infection among preterm infants in a subtropical climate. **PLoS One**. v. 9, n. 10, p. 110-16, 2014.
- HUO, X.; QIN, Y.; QI, X.; et al. Surveillance of 16 respiratory viruses in patients with influenza-like illness in Nanjing, China. **Journal of medical virology**, v. 84, n. 12, p. 1980-1984, 2012.
- JAFRI, H. S. Treatment of respiratory syncytial virus: antiviral therapies. **The Pediatric infectious disease journal**. v. 22, n. 2, p. 89-93, 2003.
- KELLOGG, J. A. Culture vs direct antigen assays for detection of microbial pathogens from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. **Archives of pathology & laboratory medicine**. v. 115, p. 5, p. 451, 1991.
- KHOR, C. S.; SAM, I. C.; HOOI, P. S.; et al. Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. **BMC pediatrics**, v. 12, n. 1, p. 32, 2012.
- LAMARÃO, L. M.; RAMOS, F. L.; MELLO, W. A.; et al. Prevalence and clinical features of respiratory syncytial virus in children hospitalized for community-acquired pneumonia in northern Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 12, n. 1, p. 119, 2012.
- LEAL, R.; KISSMAN, G.; FRANCO, C. A. D. B. Pneumonias adquiridas na comunidade; Community acquired pneumonia. **Jornal brasileiro de medicina**. v. 100, n. 5, p. 7-14, 2012.
- LESSLER, J.; REICH, N. G.; BROOKMEYER, R.; PERL, T. M.; NELSON, K. E.; CUMMINGS, D. A. Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. **The Lancet infectious diseases**. v. 9, n. 5, p. 291-300, 2009.
- LIEBERMAN, D.; LIEBERMAN, D.; SHIMONI, A.; et al. Identification of respiratory viruses in adults: nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling. **Journal of clinical microbiology**. v. 47, n. 11, p. 3439-43, 2009.
- LITTEL-VAN DEN HURK, S. V.; MAPLETOFT, J. W.; ARSIC, N.; KOVACS-NOLAN, J. Immunopathology of RSV infection: prospects for developing vaccines without this complication. **Reviews in medical virology**. v. 17, n. 1, p. 5-34, 2007.
- LITTEL-VAN DEN HURK, S.; WATKISS, E. R. Pathogenesis of respiratory syncytial virus. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 3, p. 300-5, 2012.
- LOENS, K.; VAN HEIRSTRAETEN, L.; MALHOTRA-KUMAR, S.; et al. Optimal sampling sites and methods for detection of pathogens possibly causing community-acquired lower respiratory tract infections. **Journal of clinical microbiology**. v. 47, n. 1, p. 21-31, 2009.

- LUCHSINGER, V.; AMPUERO, S.; PALOMINO, M. A.; et al. Comparison of virological profiles of respiratory syncytial virus and rhinovirus in acute lower tract respiratory infections in very young Chilean infants, according to their clinical outcome. **Journal of Clinical Virology**, v. 61, n. 1, p. 138-144, 2014.
- LUCION, M. F.; JUAREZ MDEL, V. & VIEGAS, M. Respiratory syncytial virus: clinical and epidemiological pattern in pediatric patients admitted to a children's hospital between 2000 and 2013. **Arch Argent Pediatr**, v. 112, n. 5, p. 397-404, 2014.
- LUKACS, N. W.; MOORE, M. L.; RUDD, B. D.; et al. Differential immune responses and pulmonary pathophysiology are induced by two different strains of respiratory syncytial virus. **The American Journal of Pathology**. v. 169, n. 3, p. 977-86, 2006
- MAHONY, J. B. Detection of respiratory viruses by molecular methods. **Clinical microbiology reviews**. v. 21, n. 4, p. 716-47, 2008.
- MARCONE, D. N.; ELLIS, A.; VIDELA, C.; et al. Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized and outpatient children in Buenos Aires, Argentina. **Pediatric Infection Disease Journal**. v. 32, n. 3, p. 105-10, 2013.
- MASON, S. W.;LAWETZ, C.; GAUDETTE, Y.; et al. Polyadenylation-dependent screening assay for respiratory syncytial virus RNA transcriptase activity and identification of an inhibitor. **Nucleic acids research**. v. 32, n. 16, p. 4758-67, 2004.
- MELO, W. A. & SILVA, C. Epidemiological aspects of RSV subgroups in Belém, Brazil. **Boletim Latino-americano**. v. 1, n. 8, 1992.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Palivizumabe para a prevenção da infecção pelo vírus sincicial respiratório**. Brasília-DF. 2012. 27 p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano de contingência do Brasil para o enfrentamento de uma pandemia de Influenza – Versão Preliminar – Parte II**. Brasília-DF. 73 p. 2005.
- MORRIS, J. A.; BLOUNT, R. E.; SAVAGE, R. E. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. In **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**. New York, NY, v. 92, n. 3, p. 544-9, 1956.
- MOURA, F. E. A.; BORGES, L. C.; PORTES, S. A. R.; et al. Respiratory syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil: viral antigenic group analysis and description of clinical and epidemiological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 739-43, 2003.
- MOURA, F. E.A.; NUNES, I. F.; SILVA, G. B.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory syncytial virus infections in northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. v. 74, n. 1, p. 165-7, 2006.
- MOURA, F.E.; PERDIGÃO, A.C.; RIBEIRO, J. F.; et al. Respiratory syncytial virus epidemic periods in an equatorial city of Brazil. **Influenza and other respiratory viruses**. v. 7, n. 6, p. 1128-35, 2013.
- MOYES, J.; COHEN, C.; PRETORIUS, M.; et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus-associated acute lower respiratory tract infection hospitalizations among HIV-infected and HIV-uninfected South African children, 2010–2011. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. suppl_3, p. S217-S226, 2013.
- MUFSON, M. A.; ÖRVELL, C.; RAFNAR, B.; NORRBY, E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**. v. 66, n. 10, p. 2111-24, 1985.
- NEUMAN, M. I.; MONUTEAUX, M. C.; SCULLY, K. J.; BACHUR, R. G. Prediction of pneumonia in a pediatric emergency department. **Pediatrics**. v. 128, n. 2, p. 246-53, 2011.
- OHNO, A.; SUZUKI, A.; LUPISAN, S.; et al. Genetic characterization of human respiratory syncytial virus detected in hospitalized children in the Philippines from 2008 to 2012. **Journal of Clinical Virology**, v. 57, n. 1, p. 59-65, 2013.

OHUMA, E. O.; OKIRO, E. A.; OCHOLA, R.; et al. The natural history of respiratory syncytial virus in a birth cohort: the influence of age and previous infection on reinfection and disease. **American journal of epidemiology**. v. 176, n. 9, p. 794-802, 2012.

ONU - Organização das Nações - ONU. Disponível em >http://mdgs.un.org/unsd/mdg/Resources/Static/Products/Progress2013/Goal4_Addendum.pdf< Acesso em 09 de outubro de 2013 às 9:02hrs. 2013b.

ONU - Organização das Nações Unidas. Disponível em ><http://www.onu.org.br/onu-meta-global-de-reducao-de-dois-tercos-da-mortalidade-infantil-nao-deve-ser-atingida-ate-2015/><. Acesso em 09/10/2013 às 10:55 hrs. 2013a.

OSIOWY, C. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. **Journal of clinical microbiology**. v. 36, n. 11, p. 3149-54, 1995.

PAPENBURG, J.; HAMELIN, M. È.; OUHOUMMANE, N.; et al. Comparison of risk factors for human metapneumovirus and respiratory syncytial virus disease severity in young children. **Journal of Infectious Diseases**. v. 206, n. 2, p. 178-89, 2012.

PAULIS, M.; GILIO, A. E.; FERRARO, A. A.; et al. Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. **Jornal de pediatria**, v. 87, n. 4, p. 307-313, 2011.

PAULUS, S. C.; HIRSCHFELD, A. F.; VICTOR, R. E.; et al. Common human Toll-like receptor 4 polymorphisms: role in susceptibility to respiratory syncytial virus infection and functional immunological relevance. **Clinical Immunology**. v. 123, n. 2, p. 252-57, 2007.

PFEIL, J.; TABATABAI, J.; SANDER, A.; RIES, M.; GRULICH-HENN, J. & SCHNITZLER, P. Screening for respiratory syncytial virus and isolation strategies in children hospitalized with acute respiratory tract infection. **Medicine**, v. 93, n. 25, p. e144, 2014.

PUTHOTHU, B.; KRUEGER, M.; FORSTER, J.; HEINZMANN, A. Association between severe respiratory syncytial virus infection and IL13/IL4 haplotypes. **Journal of Infectious Diseases**. v. 193, n. 3, p. 438-41, 2006.

RIBEIRO, R. S.; DUTRA, M. V. P.; HIGA, L. S. Y.; et al. Viral etiology of acute respiratory infections among children at Instituto Fernandes Figueira/FIOCRUZ/RJ. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p. 519-527, 2011.

RIXON, H. W. M.; BROWN, G.; AITKEN, J.; et al. The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. **Journal of general virology**. v. 85, n. 5, p. 1153-65, 2004.

ROCHA NETO, O. G. D.; LEITE, R. F.; BALDI, B. G. Atualização em pneumonia comunitária viral. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 59, n. 1, p. 78-84, 2004.

RODRIGUES, F. E.; TATTO, R. B.; VAUCHINSKI, L.; et al. Pneumonia mortality in Brazilian children aged 4 years and younger. **Jornal de pediatrian** v. 87, n. 2, p. 111-4, 2011.

RODRIGUEZ, W. J. Management strategies for respiratory syncytial virus infections in infants. **The Journal of pediatrics**. v. 135, n. 2, p. 45-50, 1999.

ROVIDA, F.; PERCIVALLE, E.; ZAVATTONI, M.; et al. Monoclonal antibodies versus reverse transcription-PCR for detection of respiratory viruses in a patient population with respiratory tract infections admitted to hospital. **Journal of medical virology**. v. 75, n. 2, p. 336-47, 2005.

RUDAN, I.; BOSCHI-PINTO, C.; BILOGLAV, Z.; et al. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 86, n. 5, p. 408-16, 2008.

RUOHOLA, A.; WARIS, M.; ALLANDER, T.; et al. O. Viral etiology of common cold in children, Finland. **Emerging infectious diseases**. v. 15, n. 2, p. 344, 2009.

- RUUSKANEN, O.; LAHTI, E.; JENNINGS, L. C.; MURDOCH, D. R. Viral pneumonia. **The Lancet**. v. 377, n. 9773, p. 1264-75, 2011.
- SALOMÓN, H. E.; GRANDIEN, M.; WEISSENBACHER, M. C.; AVILA, M. M. & PETTERSSON, C. A. Comparison of three techniques for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal aspirates from children with lower acute respiratory infections. **Journal of medical virology**, v. 28, n. 3, p. 159-162, 1989.
- SATO, S.; KIYONO, H. The mucosal immune system of the respiratory tract. **Current Opinion in Virology**. v. 2, n. 3, p. 225-32, 2012.
- SBPT - Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes brasileiras para tratamento das pneumonias adquiridas no hospital e das associadas à ventilação mecânica e Diretrizes brasileiras em pneumonia adquirida na comunidade em pediatria. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 33, p. 1-50, 2007.
- SILVA, L. H. A. D.; SPILKI, F. R.; RICCETTO, A. G. L.; et al. Vírus respiratório sincicial humano e metapneumovírus humano; Human respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. **Revista HCPA & Faculdade de Medicina da Universidade Federal Rio Grande do Sul**. v. 29, n. 2, p. 139-46, 2009.
- SILVEIRA, H. L. Clínica e epidemiologia das infecções agudas por vírus respiratórios em crianças atendidas em um hospital público de Uberlândia MG. 2013.
- STRALIOTTO, S. M.; SIQUEIRA, M. M.; MULLER, R. L.; et al. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35, n. 4, p. 283-91, 2002.
- SULLENDER, W. M.; MUFSON, M. A.; PRINCE, G. A.; et al. Antigenic and genetic diversity among the attachment proteins of group A respiratory syncytial viruses that have caused repeat infections in children. **Journal of Infectious Diseases**. v. 178, n. 4, p. 925-32, 1998.
- TAKIMOTO, S.; GRANDIEN, M.; ISHIDA, M.; et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence assay, and virus isolation for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions. **Journal of clinical microbiology**. v. 29, n. 3, p. 470-74, 1991.
- TANEJA, J.; MALIK, A.; MALIK, A.; et al. Acute lower respiratory tract infections in children. **Indian Pediatrics**. v. 46, n. 6, p. 509-11, 2009.
- TANG, R. S.; NGUYEN, N.; CHENG, X.; JIN, H. Requirement of cysteines and length of the human respiratory syncytial virus M2-1 protein for protein function and virus viability. **Journal of virology**. v. 75, n. 23, p. 11328-35, 2001.
- THOMAZELLI, L. M.; VIEIRA, S.; LEAL, A. L.; et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. **Jornal de pediatria**. v. 83, n. 5, p. 422-28, 2007.
- TRAN, T. L.; CASTAGNÉ, N.; BHELLA, D.; et al. The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein protomer. **Journal of general virology**. v. 88, n. 1, p. 196-206, 2007.
- TRISTAM, D. A.; WELIVERM, R. C. Respiratory syncytial virus. In LENNETTE, E. H. LENNETTE, D. A.; LENNETTE, E. T. (Ed) Diagnostic procedures for viral, rickettsial and clamydial infections. 7 ed. Washington: American Public Health Association, p. 539-53, 1995.
- UNICEF - United Nations Children's Fund - UNICEF. Disponível em > www.unicef.org< Acesso em 27/08/13 às 22:22hrs, 2013.
- UNICEF - United Nations Children's Fund. **Pneumonia: the forgotten killer of children**. UNICEF/WHO. p. 1-40, 2006.

VAN BLEEK, G. M.; OSTERHAUS, A. D.; DE SWART, R. L. RSV 2010: Recent advances in research on respiratory syncytial virus and other pneumoviruses. **Vaccine**. v. 29, n. 43, p. 7285-91, 2011.

VERAS, T. N.; SAKAE, T. M. Perfil epidemiológico dos pacientes acompanhados em um ambulatório de pneumologia pediátrica de hospital terciário Epidemiologic profile of outpatients followed in a respiratory pediatric center of tertiary hospital. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v. 40, n. 4, 2011.

WELLIVER, R. C. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. **The Journal of pediatrics**. v. 143, n. 5, p. 112-17, 2003.

WHO – World Health Organization. >www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331<Acesso em 29/08/13 às 21:22hrs, 2013.

XU, Z.; KUANG, M.; OKICKI, J. R.; et al. Potent inhibition of respiratory syncytial virus by combination treatment with 2–5A antisense and ribavirin. **Antiviral research**. v. 61, n. 3, p. 195-206, 2004.

ZLATEVA, K. T.; LEMEY, P.; MOES, E.; et al. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. **Journal of Virology**. v. 79, n. 1, p. 9157–67, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo: Vacinação Pneumonias adquiridas na comunidade de etiologia viral em viral em crianças atendidas por doença respiratória aguda no Hospital infantil Albert Sabin: prevalência, apresentações clínicas e complicações.

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

APÊNDICE B

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Ficha n° _____

Projeto de Pesquisa: **Pneumonias adquiridas na comunidade de etiologia viral em viral em crianças atendidas por doença respiratória aguda no Hospital infantil Albert Sabin: prevalência, apresentações clínicas e complicações.**

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, n° de dias: _____

Absenteísmo ao trabalho pela doença atual da criança? () Não () Sim, n° 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

Ausculda 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: _____

ANEXO 1



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

Rua Tertuliano Sales 544 – Vila União – Fortaleza – Ceará
Fone/Fax: (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^a, 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^a. do Comitê de Ética em Pesquisa