



INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA

Programa de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil

Curso de Doutorado em Saúde Materno Infantil

PREVALÊNCIA DE VÍRUS, *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*, *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* E FATORES DE RISCO PARA HOSPITALIZAÇÃO EM MENORES DE CINCO ANOS COM INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA EM RECIFE, BRASIL.

Patrícia Gomes de Matos Bezerra

Recife, junho de 2010.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PATRICIA GOMES DE MATOS BEZERRA

PREVALÊNCIA DE VÍRUS, *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*, *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* E FATORES DE RISCO PARA HOSPITALIZAÇÃO EM MENORES DE CINCO ANOS COM INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA EM RECIFE, BRASIL.

Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação em Saúde Materno Infantil do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Saúde Materno Infantil.

Área de Concentração: Epidemiologia dos principais problemas de Saúde Materno Infantil.

Linha de pesquisa: Estudos clínicos e epidemiológicos de doenças infecciosas na infância e adolescência.

Coordenador da Pós-graduação: Prof. Dr. João Guilherme Bezerra Alves

Orientador: Prof. Dr. Murilo Carlos Amorim de Britto

Co-orientador: Prof. Dr. Jailson de Barros Correia

Recife, junho de 2010.

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca Ana Bove
Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP

B574c Bezerra, Patrícia Gomes de Matos
Prevalência de vírus, Mycoplasma Pneumoniae, Chlamydomphila Pneumoniae e fatores de risco para hospitalização em menores de cinco anos com infecção respiratória aguda em Recife, Brasil / Patrícia Gomes de Matos Bezerra. -- Recife: P. G. de M. Bezerra, 2010.
97 f. : il.
Tese (doutorado) – Programa de Pós - Graduação Stricto Sensu em Saúde Materno Infantil - Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, IMIP.
Área de Concentração: Epidemiologia dos principais problemas de saúde materno infantil.
Linha de pesquisa: Estudos clínicos e epidemiológicos de doenças infecciosas na infância e adolescência.
Orientador: Prof. Dr. Murilo Carlos Amorim de Britto
Co-orientador: Prof. Dr. Jailson de Barros Correia
1. Adenovírus Humanos. 2. Bocavírus Humanos. 3. Bronquiolite. 4. Brasil. 5. Fatores de Risco. 6. Mycoplasma Pneumoniae. I. Britto, Murilo Carlos Amorim de, orientador. II. Correia, Jailson de Barros, co-orientador. III. Título.

NLM W4

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

PREVALÊNCIA DE VÍRUS, *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*, *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* E FATORES DE RISCO PARA HOSPITALIZAÇÃO EM MENORES DE CINCO ANOS COM INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA EM RECIFE, BRASIL.

Orientador: Prof. Dr. Murilo Carlos Amorim de Britto

Co-orientador: Prof. Jailson de Barros Correia

Membros:

Prof^a Dr^a Marli Tenório Cordeiro – CPqAM/FIOCRUZ

Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho – UFPE

Prof^a Dr^a Maria Júlia Gonçalves de Mello – IMIP

Prof. Dr. João Guilherme Bezerra Alves – IMIP

Prof. Dr. Murilo Carlos Amorim de Britto – IMIP (orientador)

Prof. Dr. Fernando Antonio Ribeiro Gusmão Filho – IMIP (suplente)

Curso de Doutorado em Saúde Materno Infantil do Programa de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira.

Data: 30 de junho de 2010.

PRÉ-BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

PREVALÊNCIA DE VÍRUS, *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*, *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* E FATORES DE RISCO PARA HOSPITALIZAÇÃO EM MENORES DE CINCO ANOS COM INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA EM RECIFE, BRASIL.

Orientador: Prof. Dr. Murilo Carlos Amorim de Britto

Co-orientador: Prof. Jailson de Barros Correia

Membros:

Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho – UFPE

Prof^a Dr^a Maria Júlia Gonçalves de Mello – IMIP

Prof. Dr. João Guilherme Bezerra Alves – IMIP

Prof. Dr. Fernando Antonio Ribeiro Gusmão Filho – IMIP

Curso de Doutorado em Saúde Materno Infantil do Programa de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira.

Data: 18 de junho de 2010.

Aos meus queridos pais Francisco e Helen Herta,
pelo carinho e paciência e, acima de tudo, amor e doação.

Ao meu Marcus, meu marido, meu melhor amigo,
pelo amor e apoio incondicionais.

Aos meus filhos Marcus e Mário, por saberem esperar
com carinho pela mãe.

Agradecimentos

A Deus, o perfeito autor de nossas Vidas.

Ao meu orientador, professor Murilo, por ter tido muita paciência e doar várias horas do seu tempo pessoal na orientação desta tese, realizando-a com excelência técnica, aliada à objetividade, observações certeiras e contribuindo sobremaneira para a minha formação acadêmica. Minha gratidão.

Ao meu co-orientador, professor Jailson, pela confiança, incentivo e apoio oferecidos nos momentos decisivos desta tese, aliado à grande capacidade executiva e científica. Muito obrigada.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil, professor João Guilherme, pela minha formação no Doutorado e confiança na conclusão desta tese.

Aos membros da Pré-Banca, Dr. Fernando Gusmão, Dra. Julia Mello, Dr. João Guilherme e, em especial ao Dr. Emanuel Sarinho, - que à época do internato me convenceu a fazer Pediatria, e logo após a residência médica me convenceu a fazer o Mestrado, - pelas importantes recomendações para a finalização desta tese.

Aos professores da Universidade de Liverpool, professores Paul McNamara, Angela Fonceca, Mark Hopkins e à mestranda Katie Rose, pela enorme paciência ao ensinar uma pediatra a trabalhar numa bancada de laboratório e pelo privilégio de poder trabalhar com esses importantes pesquisadores.

Aos meus colegas do doutorado: Jucille, Edvaldo, Suely, Ana Porto, Raquel, Marília pelo convívio harmonioso do grupo e especialmente à Carminha, companheira e amiga desde a fase de elaboração deste projeto, até as “andanças” por Liverpool, por ter me ajudado de várias maneiras, lendo e relendo o projeto, trabalhando exaustivamente no laboratório e fazendo relevantes observações a esta tese.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Ambulatório de Pneumologia do IMIP, Dr. Getúlio, Murilo, Izabel, Joakim e Taciana pela amizade, companheirismo e compreensão pelas minhas ausências. Ao Dr. Otelo Ferreira por me acolher nesse grupo tão importante. A Rita, do Ambulatório de Pediatria do IMIP, amiga de longa data, pelo firme apoio nas horas decisivas.

A mestranda Nancy Correia, as auxiliares de pesquisa do IMIP Shirley e Luciana, e a Neide do Laboratório do IMIP, que nos ajudaram de forma exemplar na coleta dos dados e na logística desta pesquisa.

As minhas colegas e coordenadoras da Emergência pediátrica do IMIP Dra. Maria do Socorro T. Cavalcanti e Dra. Carla Adriane L. de Araújo por nos apoiarem durante toda a fase de coleta de dados.

Ao professor José Natal Figueiroa, pelas orientações durante a análise estatística.

A Patrícia Moura, da Universidade de Pernambuco, pela gentileza de armazenar nossas amostras no laboratório durante alguns meses.

Aos pais e crianças participantes deste estudo, pela confiança nesta pesquisadora.

Ao CNPq, ao Fundo de Amparo a Pesquisa e Ensino do IMIP e ao Department of Child Health, University of Liverpool, Institute of Child Health, Alder Hey Children's Hospital, Liverpool, Reino Unido pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

Ao IMIP, por me acolher e continuar me formando desde a época de estudante.

SUMÁRIO

I. CAPÍTULO 1 – APRESENTAÇÃO.....	1
1.1. Contextualização da origem do estudo.....	1
1.2. Justificativa.....	4
1.3. Execução e produção dos artigos científicos.....	5
II. CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS.....	7
III. CAPÍTULO 3 – MÉTODOS.....	8
3.1. Desenho do estudo.....	8
3.2. Local do estudo.....	8
3.3. Período do estudo.....	8
3.4. População do estudo.....	8
3.5. Amostra e tamanho amostral.....	8
3.6. Critérios de elegibilidade.....	9
3.7. Definição e operacionalização das variáveis.....	10
3.8. Coleta de dados.....	11
3.9. Tratamento dos dados.....	16
3.10. Análise estatística.....	16
3.11. Aspectos éticos.....	16
IV. CAPÍTULO 4 – RESULTADOS/ARTIGOS.....	18
4.1. Artigo 1.....	18
4.2. Artigo 2.....	44
V. CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
5.1. Importância.....	64
5.2. Aplicabilidade.....	66
VI. CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

APÊNDICES.....	72
APÊNDICE 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	72
APÊNDICE 2 - Instrumento de coleta de dados.....	75
APÊNDICE 3 – Procedimentos para coleta e processamento laboratorial do aspirado nasofaríngeo.....	83
APÊNDICE 4 – Procedimentos laboratoriais para a extração do RNA/DNA.....	85
APÊNDICE 5 – Procedimentos laboratoriais para o Multiplex PCR.....	90
APÊNDICE 6 – Divulgação da pesquisa.....	93
6.1. Artigo 1 - Resumo publicado no American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.....	93
6.2. Artigo 1 - Resumo aceito no 3 rd Congress of the European Academy of Paediatrics Societies.....	94
6.3. Artigo 1 – Submetido ao Lancet Infectious Diseases.....	95
6.4. Artigo 2 – Submetido ao BMJ – British Medical Journal.....	96
ANEXOS.....	97
ANEXO 1 - Comprovante de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS¹ E SÍMBOLOS

A&E – accident and emergency

ANF – Aspirado nasofaríngeo

ANOVA – Análise de variância

ARI – acute respiratory infection

BV – Bocavírus

°C – graus Celsius

Chlamydomytila pneumoniae – *C. pneumoniae*

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DALY – disability-adjusted life year

EUA – Estados Unidos da América

EVW – episodic viral wheeze

FLUV – Vírus influenza

g – grama

HAdV – Adenovírus humano

HCoV – Coronavírus humano

HCoV-229E – Coronavírus humano 229E

HCoV-HKU1 – Coronavírus humano HKU1

HCoV-NL63 – Coronavirus humano NL63

HCoV-OC43 – Coronavirus humano OC43

HMPV – Metapneumovírus humano

HRSV – Vírus sincicial respiratório humano

HVPI – Vírus parainfluenza humano

¹ Nomenclatura dos vírus segundo as recomendações do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, 2009.

HRV – Rinovírus humano

IMIP – Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira

IRA – Infecção respiratória aguda

min – minuto

ml – mililitro

Mpp – *Mycoplasma pneumoniae*

Multiplex PCR – reação em cadeia da polimerase multiplex

NPA – nasopharyngeal aspirate

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – reação em cadeia da polimerase

rpm – rotações por minuto

RT-PCR - reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

SD – standard deviation

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

SUS – Sistema Único de Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

μl – microlitro

URTI – upper respiratory tract infection

UK- Reino Unido

US\$ - dólares americanos

WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura – Modelo teórico.....	3
Figura 1 – Prevalência percentual dos patógenos em aspirados nasofaríngeos de crianças menores de cinco anos com infecção respiratória aguda.....	34
Figura 2 – Frequência dos patógenos em infecções simples e co-deteccões em amostras de aspirado nasofaríngeo em crianças menores de cinco anos com infecção respiratória aguda.....	34
Figura 3 – Distribuição temporal das seis infecções mais comuns.....	35
Tabela 1 – Distribuição dos fatores de risco para hospitalização por IRA viral em lactentes e crianças. IMIP, Brasil. Abril de 2008 a Março de 2009.....	55

RESUMO

Bezerra, PGM. **Prevalência de vírus, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* e fatores de risco para hospitalização em menores de cinco anos com infecção respiratória aguda em Recife, Brasil.** [Tese] Recife: Pós-graduação em Saúde Materno Infantil, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP); 2010. 97 p.

As infecções respiratórias agudas (IRA) são causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Estima-se que cerca de quatro milhões ainda morram anualmente por IRA, e metade dessas mortes acomete lactentes com menos de seis meses de vida. Em países emergentes, as IRA são responsáveis por 30% de todas as mortes, estas especificamente relacionadas às IRA baixas. Quanto à morbidade em países em desenvolvimento, as IRA são responsáveis por até 50% dos atendimentos pediátricos ambulatoriais e 30% dos internamentos. São reconhecidamente fatores de risco para maior gravidade das IRA em crianças: prematuridade e baixo peso ao nascer, desmame precoce, desnutrição, aglomeração, tabagismo domiciliar, baixo nível socioeconômico, baixa escolaridade materna, demora e dificuldade de acesso à assistência médica, doença pulmonar crônica, cardiopatia congênita, imunodeficiência, doenças metabólicas, anomalias genéticas. Na maioria dos países emergentes, o agente etiológico associado à doença não é identificado de forma rotineira. Agentes como o vírus sincicial respiratório humano, o vírus parainfluenza humano e o vírus influenza são reconhecidos como grandes causadores de bronquiolite, gripe e pneumonia em países desenvolvidos. Estudos sobre a epidemiologia viral na região Nordeste do Brasil são escassos, de curta duração e incluindo número não significativo de patógenos respiratórios. Os objetivos da tese foram determinar a prevalência de patógenos virais e bacterianos atípicos em crianças menores de 5 anos com várias condições clínicas e gravidades de IRA, investigar os padrões temporais exibidos pelos patógenos, e descrever os fatores de risco para hospitalização por IRA viral em crianças menores de 5 anos em emergência no Recife. Foi realizado um estudo transversal, prospectivo de base hospitalar, no período de Abril de 2008 a Março de 2009. Foram incluídas no primeiro estudo crianças menores de cinco anos, com diagnóstico clínico de IRA com até sete dias de doença. No segundo estudo foram incluídas crianças menores de cinco anos, com diagnóstico clínico de IRA com até sete dias de doença com Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex positiva para vírus respiratórios: adenovírus humano (HAdV), bocavírus humano (BV), metapneumovírus humano (HMPV), rinovírus humano (HRV), vírus sincicial respiratório humano (HRSV), influenza humano A e B, parainfluenza humano 1, 2, 3 e 4, coronavírus NL63, 229E, HKUI e OC43. Foram excluídas nos dois estudos as crianças com história de cardiopatia congênita complexas, doenças pulmonares graves crônicas e imunodeficiências. No primeiro estudo a Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex foi utilizada para detectar 15 vírus respiratórios e 2 bactérias atípicas (*Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydomphila pneumoniae*) em amostras de aspirado nasofaríngeo de 407 crianças menores de cinco anos. Um ou mais patógenos foram identificados em 348 (85,5%) amostras, com co-deteccões em 160 (39,5%). Os patógenos mais prevalentes foram HRSV em 151 (37,3%), HAdV 101 (24,8%), HRV 77 (18,9%), BV 76 (18,7%), HMPV 42 (10,3%) e *Mycoplasma pneumoniae* (Mpp) 40 (9,8%). O HRSV foi associado com doença mais grave e mais casos particularmente graves de bronquiolite. Mpp foi associado com casos mais graves de pneumonia e foi detectado em 17% das crianças internadas com pneumonia. Co-deteccão não foi associada com doença mais grave ou com alguma manifestação clínica em particular. HRSV, HMPV Mpp e exibiram forte sazonalidade, com os casos de HRSV atingindo picos durante a estação chuvosa no Recife e HMPV e Mpp atingindo um pico logo em seguida. No segundo estudo foram incluídas 303 crianças menores de cinco anos com PCR Multiplex positiva para 15 vírus respiratórios, excetuando-se as bactérias atípicas. Cinco fatores de risco para hospitalização foram identificados: o peso de nascimento <2500g, mães com idade inferior a 21 anos, baixa escolaridade paterna, meses de ocorrência da doença

entre junho a novembro, e diagnóstico de pneumonia. Os dados deste estudo descrevem pela primeira vez a prevalência de patógenos respiratórios em diferentes gravidades e manifestações clínicas de infecção respiratória aguda em crianças menores de cinco anos em Recife, assim como fatores de risco para hospitalização por IRA viral nessa faixa etária.

Palavras-chave: adenovírus humanos, bocavírus humano, Brasil, bronquiolite, fatores de risco, infecção respiratória aguda, metapneumovírus, *Mycoplasma pneumoniae*, pneumonia, rinovírus, vírus sincicial respiratório humano.

ABSTRACT

Bezerra, PGM. **Prevalence of viruses, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* and risk factors for hospitalization in children under five with acute respiratory infection in Recife, Brazil.** [Thesis] Recife: "Pós-graduação em Saúde Materno Infantil, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)"; 2010. 97 p.

Acute respiratory infections (ARI) are important causes of morbidity and mortality worldwide. It is estimated that about four million still die annually from ARI, and half of these deaths affects infants under six months of life. In emerging countries, the IRA is responsible for 30% of all deaths, specifically those related to acute lower respiratory infections. As for morbidity in developing countries, the IRA are responsible for up to 50% of pediatric outpatient visits and 30% of admissions. Risk factors for increased severity of ARI in children include: prematurity and low birth weight, early weaning, malnutrition, crowding, household smoking, low socioeconomic status, maternal education, delay and difficulty of access to health care, chronic lung disease, congenital heart disease, immunodeficiency, metabolic diseases, and genetic disorders. In most developing countries, the etiologic agent associated with the disease is not identified routinely. Agents such as human respiratory syncytial virus, human parainfluenza virus and influenza viruses are recognized as major causes of bronchiolitis, influenza and pneumonia in developed countries. Studies on viral epidemiology in the northeast region of Brazil are scarce, including negligible amounts of respiratory pathogens. The objectives of the thesis were to determine the prevalence of viral pathogens and atypical bacteria in children under five years with various clinical conditions and severity of ARI, investigating the temporal patterns exhibited by pathogens, and to describe risk factors for hospitalization for viral ARI in children under 5 years in an emergency in Recife. We conducted a cross-sectional study, prospective hospital-based, from April 2008 to March 2009. In the first study, children under five years were included with a clinical diagnosis of ARI with up to seven days of illness. In the second study, children younger than five years were included with a clinical diagnosis of ARI with up to seven days of illness with Polymerase Chain Reaction Multiplex positive for respiratory viruses: human adenovirus (HAdV), human bocavirus (BV), human metapneumovirus (HMPV), human rhinovirus (HRV), respiratory syncytial virus (HRSV), human influenza A and B, human parainfluenza 1, 2, 3 and 4, coronavirus NL63, 229E, and OC43 HKUI. In both studies, children with a history of complex congenital heart disease, severe chronic lung diseases and immunodeficiencies were excluded. In the first study, Polymerase Chain Reaction Multiplex was used to detect 15 respiratory viruses and two atypical bacteria (*Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomphila pneumoniae*) in nasopharyngeal aspirate samples of 407 children. One or more pathogens were identified in 348 (85.5%) samples, with co-detections in 160 (39.5%). The most prevalent pathogens were HRSV in 151 (37.3%), HAdV 101 (24.8%), HRV 77 (18.9%), BV 76 (18.7%), HMPV 42 (10.3%) and Mpp 40 (9.8%). The HRSV was associated with more severe disease and more particularly severe cases of bronchiolitis. MPP was associated with more severe cases of pneumonia and was detected in 17% of children hospitalized with pneumonia. Co-detection was not associated with more severe disease or with any clinical manifestation in particular. HRSV, HMPV and Mpp exhibited strong seasonal patterns, with HRSV cases peaking over the rainy season in Recife and both HMPV and Mpp peaking soon afterwards. In the second study, 303 children with Multiplex PCR positive for 15 respiratory viruses, except for atypical bacteria, were included. Five risk factors for hospitalization were identified: birth weight <2500g, mothers younger than 21 years, low parental educational level, months of occurrence of the disease between June to November, and pneumonia. Our data describe for the first time the prevalence of respiratory pathogens in different severity and clinical manifestations of acute respiratory infection in children under five years in Recife, as well as risk factors for hospitalization for viral ARI in this age group.

Key words: acute respiratory infection, Brazil, bronchiolitis, human adenovirus, human bocavirus, metapneumovirus, *Mycoplasma pneumoniae*, pneumonia, respiratory syncytial virus rhinovirus, risk factors.

I. CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO

Esta tese inicia-se com a exposição da contextualização da origem do estudo, a justificativa, execução e produção dos artigos científicos. Em seguida, expõe os métodos. Os resultados são apresentados por meio de dois artigos originais submetidos para publicação. Concluem o texto as considerações finais que destacam a importância desta pesquisa e a aplicabilidade de seus resultados.

1.1. Contextualização da origem do estudo

As infecções respiratórias agudas (IRA) são causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo.¹ Apesar do número de mortes em crianças abaixo de cinco anos no mundo ter declinado de 12,5 milhões, em 1990, para menos de 9 milhões, em 2008, estima-se que cerca de quatro milhões ainda morram anualmente por IRA, e metade dessas mortes acomete lactentes com menos de seis meses de vida e a maioria morre por pneumonia.²⁻⁴ Em países emergentes, as IRA são responsáveis por 30% de todas as mortes, estas especificamente relacionadas às IRA baixas.^{5,6} No Brasil, apesar das IRA figurarem como a segunda causa de óbito em crianças abaixo de cinco anos, observou-se um declínio na taxa de mortalidade proporcional, no período de 1996 a 2006, de 8.0 para 5.8, respectivamente.⁷ Em Pernambuco, essa taxa foi de 6.3% em 2006. Em 2008, no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Pernambuco, foram realizadas na Emergência Pediátrica 68.731 consultas de crianças abaixo de 14 anos. Desse total, 1202 (17.8%) crianças foram internadas por pneumonia, ocorrendo 23 óbitos.⁸ A taxa de letalidade foi de 1.9%.⁹

Quanto à morbidade em países em desenvolvimento, as IRA são responsáveis por até 50% dos atendimentos pediátricos ambulatoriais e 30% dos internamentos.¹⁰ São

reconhecidamente fatores de risco para maior gravidade da IRA em crianças: prematuridade e baixo peso ao nascer, desmame precoce, desnutrição, aglomeração, tabagismo domiciliar, baixo nível socioeconômico, baixa escolaridade materna, demora e dificuldade de acesso à assistência médica, doença pulmonar crônica, cardiopatia congênita, imunodeficiência, doenças metabólicas, anomalias genéticas.^{11,14} O modelo teórico (figura) proposto contempla os diversos fatores de risco envolvidos na cadeia de eventos que levam à hospitalização por IRA viral. Estima-se que mais da metade desses pacientes recebam tratamento inadequado, representada principalmente pelo retardo no início dos antibióticos, ou pelo uso desnecessário dos mesmos, contribuindo negativamente para o aumento da resistência microbiana na comunidade.¹⁵ Na maioria dos países emergentes, o agente etiológico associado à doença não é identificado de forma rotineira, a despeito dos avanços tecnológicos dos métodos diagnósticos.¹⁶ A exemplo da pneumonia, a colheita de material das vias aéreas, representativo do foco infeccioso, é de difícil execução. Estima-se que em apenas cerca de 40% das IRA baixas se consegue identificar o agente viral, mesmo usando-se métodos tradicionais de investigação como cultura viral, sorologia, testes rápidos de detecção de antígenos ou até mesmo a reação em cadeia da polimerase (PCR).¹⁷ Agentes como o vírus sincicial respiratório humano (HVSr), o vírus parainfluenza humano (HVPI) e o vírus influenza (FLUV) são reconhecidos como grandes causadores de bronquiolite, gripe e pneumonia em países desenvolvidos.¹⁸ O HVSr é a principal causa de IRA baixa e de hospitalizações em lactentes e crianças pequenas, infectando cerca de metade deles no primeiro ano de vida, com pico entre dois e seis meses de vida.² A prevalência da *Chlamydomphila pneumoniae* e do *Mycoplasma pneumoniae* (Mpp) entre as IRA nas crianças são também desconhecidas em várias regiões do Brasil, embora ambos sejam

importantes agentes de IRA tanto em países desenvolvidos com em desenvolvimento.^{19,20}

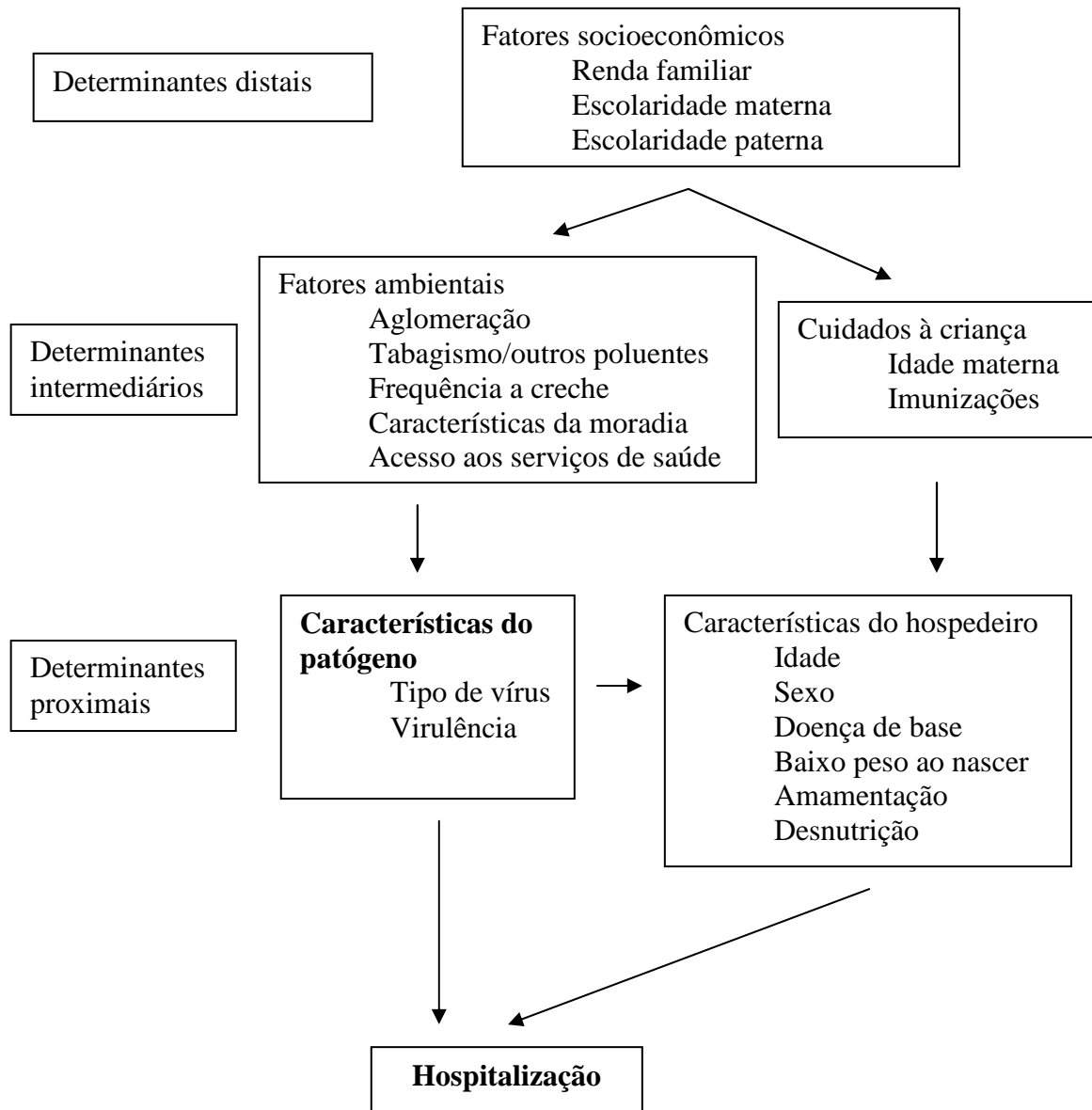


Figura – Modelo teórico para determinação de fatores de risco para hospitalização por IRA viral.

1.2. Justificativa

Nos últimos 20 anos, vários centros brasileiros, principalmente das regiões Sul²¹⁻²³ e Sudeste²⁴⁻²⁶, vêm publicando artigos sobre etiologia das IRA, com ênfase em agentes virais. Entretanto, muitos se originam de grandes centros urbanos, não refletindo, necessariamente, a realidade de um país continental como o Brasil. A comparação entre as pesquisas é dificultada pelos diferentes delineamentos dos estudos, pelas características da amostra como idade dos participantes, local do estudo (comunitário ou hospitalar), diagnóstico à admissão e gravidade da doença, e duração do estudo.

O conhecimento a respeito da epidemiologia das IRA, com ênfase nos agentes etiológicos associados a essas infecções, é fundamental para o planejamento de intervenções preventivas e terapêuticas, que reduzam o impacto sobre a morbimortalidade causada pelas IRA. Na década de 70, alguns estudos em países em desenvolvimento, utilizando punções pulmonares aspirativas, contribuíram significativamente para o conhecimento da etiologia das pneumonias bacterianas em crianças.²⁷⁻²⁸ Entretanto, por se tratar de método invasivo, sua aplicação na pesquisa e na clínica tornou-se inviável. A dificuldade de se estabelecer um diagnóstico etiológico contribui para a realização de intervenções desnecessárias, como o uso de antimicrobianos, exames laboratoriais inespecíficos, causando sofrimento ao paciente, hospitalizações desnecessárias e desperdício de recursos. Outro aspecto de importância para o planejamento de estratégias de prevenção é o conhecimento da sazonalidade ou distribuição temporal dos agentes patogênicos, especialmente em um país com diferentes climas.

Além do agente etiológico, o conhecimento de fatores de risco para hospitalização por IRA também é importante para o desenvolvimento de ações

preventivas, por planejadores de saúde, e para o desenvolvimento de ações preventivas e terapêuticas por médicos e outros profissionais de saúde.

Por essas razões, percebemos que estudos sobre a epidemiologia viral em nossa região eram escassos, de curta duração e incluindo número não significativo de patógenos respiratórios. A oportunidade de realizar pesquisa colaborativa com outro centro que dispõe de mais recursos tecnológicos também foi levada em consideração, por conta do intercâmbio de conhecimentos e de tecnologias que proporcionam avanços mútuos e abrem oportunidades para novas pesquisas.

1.3. Execução e produção dos artigos científicos

Em 2005, um grupo de pesquisadores no IMIP, motivados pela ideia da pesquisa com vírus respiratórios e pelo intercâmbio entre estudantes de pós-graduação da Universidade de Liverpool e do IMIP, percebeu que aquele seria o momento adequado para o planejamento de um projeto sobre a prevalência e patogênese das IRA em crianças abaixo de cinco anos. Os contatos iniciais foram realizados pelo professor Jailson Correia com os professores C.A. Hart e Luis Cuevas que já haviam publicado artigos sobre HVS-R e metapneumovírus humano (HMPV) na cidade de Aracajú, identificados através da técnica de PCR.^{29,30} Em 2006, o projeto foi submetido ao CNPq, tendo sido aprovado. Em 2007, o Prof. Paul McNamara juntou-se a o grupo e solicitou que as primeiras etapas do processamento laboratorial fossem realizadas ainda no IMIP. O armazenamento das amostras de aspirado nasofaríngeo a -70°C foi feito nos primeiros meses no laboratório de virologia da Universidade de Pernambuco. Em março de 2008 se deu início à coleta dos dados. Em maio de 2009 as amostras seguiram por Courier para o Laboratório de Virologia da Universidade de Liverpool. Em junho, essa doutoranda viajou para Liverpool para estágio doutoral, orientada pelos professores

Mark Hopkins, Paul McNamara e Angela Fonceca. Inicialmente, recebeu treinamento sobre biossegurança, técnica de pipetagem e manuseio dos equipamentos. As três primeiras semanas foram dedicadas à separação de amostras e extração de DNA e RNA em equipamento robotizado, que permitia a extração simultânea de DNA e RNA de 48 amostras por dia. Na última semana, aprendeu a utilizar os diferentes protocolos para a realização de PCR Multiplex para a maioria dos agentes patogênicos. Nos meses seguintes, a mestrandia Katie Rose da Universidade de Liverpool realizou os PCR para bocavírus humano (BV). Após discussão em conjunto com o grupo de Liverpool optou-se por produzir um artigo sobre prevalência dos vírus, juntamente com *Mpp* e *C. pneumoniae* e um segundo sobre fatores de risco para hospitalização por infecção viral.

II. CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

Estudo 1:

Determinar a prevalência de patógenos virais e bacterianos atípicos em crianças menores de 5 anos com várias condições clínicas e gravidades de IRA, e investigar os padrões temporais exibidos pelos patógenos.

Estudo 2:

Descrever os fatores de risco para hospitalização por IRA viral em crianças menores de 5 anos em emergência no Recife

III. CAPÍTULO 2 - MÉTODO

3.1. Desenho do estudo

Transversal prospectivo de base hospitalar.

3.2. Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Curso de Doutorado da Pós-graduação em Saúde Materno Infantil do IMIP e os dados foram coletados na Emergência Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) em Recife, Pernambuco, que assiste a população pediátrica da região metropolitana do Recife e de outras cidades do estado, usuária do Sistema Único de Saúde.

3.3. Período do estudo

A coleta de dados foi realizada entre abril de 2008 e março de 2009.

3.4. População do estudo

Lactentes e pré-escolares com infecção respiratória aguda usuários do Sistema Único de Saúde do Nordeste do Brasil.

3.5. Amostra e tamanho amostral

Utilizou-se uma amostra de conveniência, calculada em 500 participantes, considerando o número estimado de 2330 internamentos anuais e o número estimado de

9461 consultas mensais por doença respiratória em crianças abaixo de cinco anos.² Esta amostra permitiu estimar a prevalência da positividade mínima e máxima de cada vírus. Assumindo que o mínimo seja de 7% (para BV ou HMPV) e o máximo de 40% (para HVSR), com um intervalo de confiança de 95%, esta amostra permitiu estimar as prevalências com uma margem de erro de +/-2 e +/-5%, respectivamente. A amostra foi obtida mensalmente de forma proporcional ao número de atendimentos por doença respiratória conforme a variação sazonal durante um ano calendário. Manteve-se a proporção mensal de crianças atendidas na emergência do IMIP com IRA, o que resultou em um número de participantes assim distribuídos no ano de coleta: abril – 58, maio – 56, junho – 45, julho – 41, agosto – 37, setembro – 38, outubro – 40, novembro – 38, dezembro – 32 janeiro – 38, fevereiro – 32, março – 45.

3.6. Critérios de elegibilidade

Os participantes foram lactentes e pré-escolares encaminhados ou que procuraram espontaneamente a emergência do IMIP.

3.6.1 Critérios de inclusão.

Foram incluídos lactentes e pré-escolares com diagnóstico clínico de IRA com até sete dias de início da doença.

3.6.2. Critérios de exclusão.

Foram excluídas lactentes e pré-escolares com história de cardiopatia congênita hemodinamicamente significativa ou complexa e crianças com deformidades e ou malformações intra e extratorácicas com comprometimento da função pulmonar.

² Os dados sobre internamentos e consultas usados para o cálculo do tamanho amostral foram do ano de 2005.

3.7. Definição e operacionalização das variáveis

O diagnóstico clínico de IRA foi baseado na combinação de sinais e sintomas gerais e do aparelho respiratório alto (coriza, dor de ouvido, dor de garganta, etc) e/ou baixo (tosse, dispnéia, sibilância, estridor, estertores ou cianose) por até sete dias do início da doença. Os diagnósticos de pneumonia, bronquiolite, sibilância episódica viral e infecção das vias respiratórias superiores foram classificados pelos pesquisadores após consensualmente rever registros de acordo com definições “a priori”.

- Bronquiolite foi definida como doença aguda em lactentes menores de 18 meses de vida, caracterizada por sinais e sintomas prévios de infecção respiratória de vias aéreas superiores, seguida por dificuldade respiratória, no qual sibilância pode estar presente.

- Pneumonia foi definida como uma doença respiratória aguda associada à taquipnéia e tiragem intercostal ou em um paciente com estertores difusos ou focais, diminuição do murmúrio vesicular, na presença ou não de confirmação radiológica.

- Sibilância episódica viral³¹ foi definida como sibilância durante períodos de tempo distintos, muitas vezes em associação com evidência clínica de uma rinofaringite viral, com ausência de sibilância entre os episódios.

- Infecção aguda do trato respiratório superior foi definida como uma doença aguda, caracterizada pela presença de sinais e sintomas gerais e do aparelho respiratório, como febre, coriza, tosse seca ou produtiva, e na qual taquipnéia, tiragem intercostal e estridor podem estar presentes. A gravidade da doença foi definida como:

- Doença muito leve – infecção respiratória aguda alta sem internamento hospitalar;

- Doença leve – infecção respiratória aguda baixa sem internamento hospitalar;

- Doença moderada – infecção respiratória aguda alta e/ou baixa com internação hospitalar sem necessidade de oxigenioterapia;

- Doença grave - infecção respiratória aguda alta e/ou baixa com internação hospitalar com necessidade de oxigenioterapia.
- Hipoxemia: definida como saturimetria de oxigênio menor que 93%, aferida pela auxiliar de pesquisa através da oximetria de pulso antes da coleta do aspirado nasofaríngeo.

3.8. Coleta de dados

Os pacientes foram identificados pelos médicos plantonistas da emergência pediátrica do IMIP, previamente cientes do estudo, e convidados pela auxiliar de pesquisa, uma técnica de enfermagem especialmente treinada para este estudo. Para garantir a uniformidade e a qualidade das informações coletadas, assim como da obtenção das amostras de aspirado nasofaríngeo, a mesma profissional coletou-as ao longo de todo o estudo. A auxiliar de pesquisa permaneceu no setor de emergência de segunda a sexta feira durante 8 horas diurnas e identificou, a cada dia, o número de pacientes calculado na amostra. Uma busca ativa na unidade de observação da emergência foi realizada para identificar pacientes que foram atendidos durante o período noturno e que poderiam ser incluídos no estudo. Os pais/responsáveis que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice 1) e responderam a um instrumento padronizado de coleta de dados (apêndice 2), contendo todas as informações sobre história médica pessoal pregressa, informações socioeconômicas, ambientais e demográficas, história médica atual, achados clínicos, diagnósticos e condição de alta. A avaliação da história médica pessoal pregressa foi obtida através das seguintes variáveis: peso de nascimento (obtido por observação no cartão de saúde da criança e analisado de forma dicotômica em

menor ou igual a 2500g ou maior de 2500g), idade gestacional ao nascer (obtido por observação no cartão de saúde da criança e analisado como menor ou igual a 37 semanas, entre 38 e 41 semanas e 42 ou mais semanas de gestação), pneumonias prévias, episódios prévios de sibilância, outras doenças prévias, hospitalizações prévias, doenças alérgicas comuns referidas por médico, histórico de amamentação e histórico de imunizações. A avaliação socioeconômica, ambiental e demográfica foi realizada a partir das seguintes variáveis: tipo de moradia, material predominante na construção da moradia, número de cômodos no domicílio, número de cômodos servindo de dormitório, acesso a água encanada dentro da moradia, tratamento da água usada para beber, tipo de luz utilizada, tipo de combustível utilizado para cozimento dos alimentos, número de pessoas que dormem no domicílio, número de pessoas que dormem no mesmo cômodo com a criança, presença da mãe no domicílio, idade materna, ocupação materna, escolaridade materna, presença do pai no domicílio, idade paterna, ocupação paterna, escolaridade paterna, número de irmãos mais novos, número de irmãos mais velhos, renda familiar total, renda *per capita*, inscrição em programa assistencial do governo, presença de fumantes no domicílio. A avaliação da história da doença atual foi obtida de variáveis relacionadas a sinais e sintomas do aparelho respiratório como coriza, tosse, dificuldade para respirar, chiado/sibilância, apnéia, cianose, gemido, febre, otalgia. As variáveis relacionadas ao exame físico na admissão incluíram: peso, altura, temperatura axilar, frequência cardíaca, frequência respiratória, tiragem, cianose, saturometria de oxigênio (oxímetro de pulso modelo 3301, BCI, Smiths Medical PM, Inc., EUA) e sinais de otite média aguda na otoscopia realizada por médico. As medidas das crianças foram combinadas para se obter os índices peso para idade, altura para idade e peso para altura, expressos em escores Z, utilizando-se o programa EpiNut (Epi Info versão 6.0). O *deficit* foi definido por escore $Z < - 2$.

3.8.1. Coleta do aspirado nasofaríngeo

A coleta da secreção nasofaríngea foi realizada até no máximo quatro horas após o atendimento da criança na emergência pediátrica. Após a instilação de dois ml de solução salina na narina, usou-se sonda de aspiração traqueal estéril número 06 acoplada a uma bomba de aspiração manual. A secreção aspirada foi depositada em três tubos estéreis e misturada com um ml de solução salina tamponada cada, sendo estocadas em caixa de gelo a 4°C por até duas horas, e levadas para o laboratório do IMIP.

O tratamento ficou a critério do médico plantonista da emergência, assim como a realização de exames laboratoriais e radiografias de tórax. Após a alta/transferência ou óbito, a auxiliar de pesquisa revisou informações do prontuário médico e complementou o instrumento padronizado de coleta de dados.

3.8.2. Processamento laboratorial das amostras

O primeiro processamento laboratorial foi realizado no IMIP nas primeiras duas horas da coleta por técnica de laboratório (apêndice 3). O aspirado nasofaríngeo misturado à solução salina tamponada foi filtrado através de tubo cônico graduado através de tecido de 60 microns (Sefar Tenyl, Brasil) com pipeta de um ml e o volume pós-filtrado foi anotado. 10 µl da amostra foram pipetados e misturados em tubo (Eppendorf, Brasil) de um ml com 10 µl de *trypan blue* (Vertec, Brasil). Inicialmente, foram determinadas as concentrações das células e suas contagens diferenciais, através de técnicas já padronizadas. A qualidade das amostras foi determinada contando-se as células viáveis que não coravam pelo *trypan blue* em um hemocitômetro. O percentual de células viáveis é o número de células viáveis dividida pelo número total de células

(não viáveis mais viáveis), multiplicado por 100. Usando o volume pós-filtração, o número de células totais na amostra foi calculado. A amostra foi centrifugada a 500 g (3800 rpm) por cinco minutos a 4°C. O sobrenadante dividido em alíquotas de 500 µl e estocado em criotubo na geladeira a 2 a 8°C. Dez µl de 2-mercaptoetanol (Sigma – Aldrich, Brasil) foi adicionado a um ml de RLT lysis buffer (QIAGEN group, Reino Unido). Um volume de 350 µl dessa solução, suficiente para lisar 500 células, foi adicionado ao agrupamento de células (cell pellet). Para um número maior de células, o volume proporcional dessa solução foi calculado. A solução foi estocada em criotubos no freezer a -70°C, em alíquotas de 500 µl. O filtro de tecido com secreção retida também foi congelado em criotubo a -70°C.

3.8.2.1. Extração de RNA/DNA e Multiplex RT-PCR

As amostras congeladas foram transportadas para a Universidade de Liverpool, para a extração de RNA/DNA e realização de Multiplex RT-PCR. As extrações de RNA e DNA totais foram realizadas usando-se o QIA symphony Mini Kit (Pathogen Complex 200 protocol), de acordo com as instruções do fabricante e imediatamente congeladas a -70°C, até a realização do PCR (apêndice 4).

Dezessete patógenos respiratórios virais e bacterianos (HVSr, HMPV, HPIV 1, 2, 3, 4, FLUV A e B, BV, HAdV, HCoV- 229E, NL63, OC43 e KHU1, HRV, Mpp, *C.pneumoniae*) foram detectados usando-se protocolos diagnósticos de Multiplex RT-PCR (apêndice 5), previamente descritos.³² Os PCRs com alvos de DNA utilizaram 10 µl de ácido nucléico purificado com o Roche LC480 Probes Master kit (Roche Diagnostics, Burgess Hill, UK) ou Qiagen Quantitect Probe PCR kit (Qiagen, Crawley, UK) para o Multiplex PCR do HAdV, Mpp, *C. pneumoniae* e PCR para BV, respectivamente, de acordo com as instruções dos fabricantes. As condições térmicas de

ciclagem foram conforme descritas anteriormente, exceto pela remoção do “hold” de 50°C para a transcrição reversa, e a extensão do “hold” de ativação da enzima a 95°C para cinco minutos para o Roche LC 480 Probe Master kit ou 15 minutos para o Qiagen Quantitect Probe PCR kit. Todos os ensaios foram realizados no Lightcycler 480 real-time PCR machine (Roche).

3.9. Tratamento dos dados

Para a análise estatística, os dados foram digitados em dupla entrada, validados e analisados no SPSS versão 9.0.0.

3.10. Análise estatística

Primeiro artigo: inicialmente, realizou-se a análise descritiva dos dados, construindo-se tabelas de distribuição de frequência, calculando-se medidas de tendência central (média ou mediana) e de dispersão (desvios-padrão e distância interquartil), dependendo de ser ou não as distribuições normais.

A relação entre os diferentes patógenos respiratórios e categorias de gravidade da doença ou outras condições clínicas, foi estudada usando-se a análise de variância (ANOVA). Quando foram detectadas diferenças entre os vários grupos, o teste exato de Fisher foi realizado para identificar diferenças entre os grupos, considerando-se como significantes as com um valor de p inferior a 0,05.

Segundo artigo: utilizou-se o qui-quadrado de associação de Pearson e de Fisher para a determinação das variáveis a serem incluídas no modelo de regressão, tendo sido consideradas como significantes as com p inferior a 0,25. Realizou-se análise de regressão logística pelo método “stepwise/backwise”, considerando-se como significantes aquelas com p inferior a 0,05. A ocorrência de interações entre as variáveis foi testada, assim como o ajuste do modelo, através do teste de Hosmer & Lemeshow.

3.11. Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP, nº 896/06 (ANEXO 1), com registro no SISNEP através do CAEE

0150.0.099.000-06. Todas as orientações éticas para experimentação em seres humanos foram rigorosamente observadas. Todas as crianças participantes do estudo tiveram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido assinado pelos seus pais ou responsáveis (APÊNDICE 1).

IV. CAPÍTULO 4 – RESULTADOS/ARTIGOS

4.1. Artigo 1

Title

Disease severity and clinical condition associations in ARI.

Authors

Patrícia G M Bezerra^{1,2}, Murilo C A de Britto^{1,2}, Jailson B Correia^{1,3}, Maria do Carmo M B Duarte¹, Luis E. Cuevas⁴, Katie Rose⁵, Angela Fonceca⁵, Mark Hopkins⁶, C.A. Hart⁶, Paul S McNamara^{5*}.

Affiliations:

¹Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil

²Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, Brazil

³Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil

⁴UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), Geneva, Switzerland

⁵Institute of Child Health, University of Liverpool, Alder Hey Children's Hospital, Liverpool, UK.

⁶Department of Medical Microbiology, University of Liverpool, Liverpool, UK.

*Corresponding author

Abstract

Rationale

Acute respiratory infection (ARI) is a leading cause of morbidity and mortality in children worldwide. The aims of this study were to determine the viral causes of ARI in different clinical conditions and their impact on severity of disease in infants and preschoolers in North-eastern Brazil.

Methods

Clinical and demographic data, and nasopharyngeal aspirates (NPA) were prospectively collected from infants and preschoolers presenting with ARI over one year to a paediatric A&E department. Clinical diagnosis was based on standard criteria on discharge from hospital and disease severity based on the presence of lower respiratory tract signs, need for hospital admission and need for oxygen. Multiplex PCR was used to detect 17 common respiratory viral and atypical bacterial pathogens.

Results

407 (236 male) infants and preschoolers were recruited with a median age of 8 months. One or more pathogens were identified in 348 (85.5%) samples with co-detections being common 160 (39.5%). Overall, the most prevalent pathogens were HRSV in 151 (37.3%), HAdV 101 (24.8%), HRV 77 (18.9%), BV 76 (18.7%), HMPV 42 (10.3%) and Mpp 40 (9.8%). Generally, pathogens were detected in similar proportions in all severities and clinical manifestations of ARI. However, HRSV was associated with more severe disease and particularly more severe cases of bronchiolitis. Mpp was associated with more severe cases of pneumonia and was detected in 17% of children

admitted to hospital with pneumonia. Co-detection was not associated with more severe disease or with particular clinical manifestations of ARI.

Conclusions

In this population, viral pathogens were identified in a very high proportion of preschool children with ARI, with co-detection being particularly common. Pathogen prevalence in some clinical conditions differed markedly from that described in the published literature, as of the high prevalence of Mpp, and may have clinical implications regarding future antibiotic guidelines.

Key words: infant, preschool, respiratory tract infections, respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, human adenovirus, rhinovirus, human bocavirus, *Mycoplasma pneumoniae*, PCR, Brazil.

Introduction

Acute respiratory infection (ARI) is an important cause of morbidity and mortality with a worldwide disease burden estimated at 112 900 000 disability adjusted life years (DALYs) and 3.5 million deaths.^{1,2} A strict definition of ARI would include all infections of the respiratory tract. However, in practice, acute lower respiratory infection accounts for most of the disease burden. ARI causes about 20% of all deaths in pre-school children worldwide, with 90% of these deaths being due to pneumonia.^{3,4} Risk factors for severe ARI include malnutrition, low birth weight, passive smoking, non-breastfeeding, low socio-economic status and overcrowding and consequently, most of the morbidity associated with ARI is found in the developing world.⁵⁻⁸ As mortality in children under-5 declines from 50 to 10/1000 per year, the proportion of deaths directly attributable to ARI declines from 23% to 15%.⁹

ARI causative organisms are predominantly viral or bacterial (most commonly *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*), although it is not possible to differentiate between them based on clinical signs or radiology. Over the past decade, the importance of viral aetiological agents in ARI has been clarified with the discovery of novel coronaviruses (NL63 and HKU1), human metapneumovirus (HMPV), and human bocavirus (BV).¹⁰⁻¹³ This expansion in the number of potential viral pathogens, combined with recent advances in the ability to test for multiple organisms using multiplex PCR, has highlighted the potential role of viral co-infection in ARI, although its significance, certainly with regard to disease severity, remains unclear.^{14,15}

The viral causes of ARI in children under-5 years have been studied prospectively and retrospectively in multiple different environments and populations. Respiratory

syncytial virus, HMPV, HRV and Parainfluenza virus (HPIV) have consistently been shown to predominate, with co-detection with more than one viral pathogen occurring in 4-33% of children.¹⁵⁻¹⁸ Very few studies have examined in detail the viral causes of specific clinical conditions in the under-5 age group and those that have tended to focus on bronchiolitis. Equally, few studies have attempted to determine whether particular viruses are associated with differing severities of disease. Those that have concentrated on the more severe end of the disease severity spectrum i.e. those children hospitalized or ventilated on intensive care.¹⁹

The aim of this study was to determine the prevalence of viral and atypical bacterial pathogens in a prospective observational study of clinically and demographically well-characterised infants and preschoolers presenting to an A&E department in Brazil with various clinical manifestations and severities of acute respiratory infection. This study also aimed to investigate the temporal patterns exhibited by these pathogens.

Methods

Setting and study design

This prospective observational study on infants and preschoolers with ARI was conducted between April 2008 and March 2009, at the Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), a large publically funded teaching hospital in Recife, Pernambuco, Northeast Brazil. IMIP Emergency department provides secondary and tertiary medical care, but also to self reported patients, to the majority of these

predominantly low-income families. The IMIP's Ethics Committee and the National Research Ethics Office of Brazil approved the study.

A pilot study to examine feasibility (specifically aspects of accrual, data and sample collection) was conducted prior to the main study. A trained research assistant recruited patients whilst they were in the A&E and collected clinical and demographic data from parents/guardians between 7 am and 3 pm (Monday to Friday).

Sample size

A convenient sample of 500 participants was used to estimate the positive minimum and maximum prevalence of each virus. Assuming that the minimum is 7% (for BV and HMPV) and a maximum of 40% (for HRSV), with an interval of 95%, this sample allowed us to estimate the prevalence rates with a margin of error of $\pm 2\%$ and $\pm 5\%$, respectively.

Subjects

Infants and preschoolers with upper (coryza, earache, sore throat etc) and/or lower (dyspnoea, wheezing, stridor, fine crackles) respiratory tract manifestations of ARI were eligible for inclusion. They were excluded if their symptoms were prolonged (i.e. lasting for longer than 7 days at enrollment). Written informed consent was obtained from parents of all participants prior to their participation in the study.

Data and sample collection

Baseline observations including temperature, oxygen saturation, respiratory and pulse rate were recorded on admission to the A&E department and daily (if admitted)

thereafter. Nasopharyngeal aspirate (NPA) collection was performed by a research assistant within 4 hours of admission to A&E according to a standardised protocol.²⁰

The clinical outcome and the discharge diagnosis for each child were both transcribed from the medical records. The diagnosis for each child was based upon the final discharge diagnosis, which was based on criteria by attending physicians in either A&E (if discharged home) or the paediatric ward (if admitted). Four conditions predominated: upper respiratory tract infection (URTI), bronchiolitis, episodic viral wheeze (EVW)/asthma and pneumonia.

Disease severity was assessed both by need for admission to hospital, and by symptoms, signs and observations in A&E at the time of recruitment and was categorized as follows:

1. Very mild (upper respiratory tract symptoms only but not needing hospital admission);
2. Mild (lower respiratory tract symptoms but not needing hospital admission);
3. Moderate (lower respiratory tract symptoms +/- upper respiratory tract symptoms, needing hospital admission but not oxygen);
4. Severe (lower respiratory tract symptoms +/- upper respiratory tract symptoms, needing hospital admission and oxygen).

RNA/DNA extraction

Each nasopharyngeal aspirate was diluted in 3mls of normal saline before being centrifuged at 500g for 10 minutes at 4°C. The resultant cell pellet was resuspended in a solution of 2-mercaptoethanol (Sigma – Aldrich, Brazil) and RLT lysis buffer

(QIAGEN group) and then frozen at -70°C. RNA/DNA were extracted from each sample using the QIA symphony Mini Kit (Pathogen Complex 200 protocol) according to manufacturers instructions prior to PCR analysis.

PCR assays for Respiratory Pathogens

Seventeen viral and atypical bacterial respiratory pathogens (HRSV, HMPV, HPIV 1, 2, 3, 4, influenza A, influenza B, BV, adenovirus, coronavirus 229E, NL63, OC43, KHU1, human rinovirus, Mpp, *C. pneumoniae*) were detected using diagnostic PCR protocols in place at the Royal Liverpool University Hospital, UK. Multiplex reverse-transcription PCR was performed as described previously.²¹ PCRs with DNA targets utilised 10 ul purified nucleic acid with the Roche LC480 Probes Master kit (Roche Diagnostics, Burgess Hill, UK) or Qiagen Quantitect Probe PCR kit (Qiagen, Crawley, UK) for the HAdV, *Mycoplasma pneumoniae* (Mpp), *C. pneumoniae* multiplex PCR and BV PCR, respectively. Thermal cycling conditions were as described previously except for removal of the 50°C hold for reverse transcription, and the enzyme activation hold at 95°C was extended to five min for the Roche LC 480 Probe Master kit or 15 min for the Qiagen Quantitect Probe PCR kit. All assays were performed in a Lightcycler 480 real-time PCR machine (Roche).

Statistical Analysis

The relationship between individual respiratory pathogens and disease severity categories or different clinical conditions was studied using a one-way ANOVA. Where differences were detected between the various groups, a Fisher Exact test was performed to find out which groups were statistically different considering a significant

p-value < 0.05. Statistical calculations were performed using SPSS 18.0.1 statistical package (SPSS Inc, Chicago).

Results

Demographic and Clinical Characteristics

407 infants and preschoolers (236 males; 171 females) and attending A&E at the IMIP Children's Hospital with signs and symptoms of ARI were identified by a research assistant and recruited to the study. The median (range) age of study participants was 8 (0-57) months, with 281 (69%) of participants being less than 12 months of age. The occurrence of co-morbidities in the study population was 19 (4.7%), whilst the median of breastfeeding length was three months. Overall 175 (43%) participants of the study population came from households in which at least one person smoked. The mean (SD) primary household income for the study population was US\$275 (160), approximately half the average monthly income in Brazil. Brazil's mandatory nine years of education had been completed by 175 (43%) of mothers and 179 (44%) of fathers. The mean (SD) number of people sharing a bedroom with the study participant was 3.0 (1.6), with 105 (26%) sharing with at least four people.

Disease severity was classified as very mild in 23 (5.7%) cases; mild in 173 (42.5%); moderate in 169 (41.5%) and severe in 42 (10.3%) cases. Just over half 211 (52%) the study participants were admitted to a paediatric ward from the A&E and three children died from pneumonia. Standard clinical criteria were used to differentiate between different clinical manifestations of ARI. Bronchiolitis, pneumonia,

EVW/asthma and URTI comprised 398 (97.8%) of the discharge diagnoses from either A&E or paediatric ward, with the remainder comprising children with whooping cough, pneumonia with pleural effusion and bronchiolitis obliterans. Admission to hospital occurred in nearly half the children with bronchiolitis (105/234; 49.8%), just over three quarters of those with pneumonia (84/109; 77.1%) and just under one quarter of those with EVW/asthma (13/55; 23.6%).

PCR Results

At least one viral or atypical bacterial pathogen was found in 348/407 (85.5%) nasopharyngeal samples collected. Overall, the most commonly identified pathogens were HRSV 151 (37.1%), HAdV 101 (24.8%), HRV 77 (18.9%), BV 76 (18.7%), HMPV 42 (10.3%) and Mpp 40 (9.8%) [Figure 1]. Parainfluenza viruses were identified in 34 (8.4%) of samples, with HPIV3 representing the majority (20/4.9%) (data not shown). Coronaviruses (HCoV) were found in 13 (3.2%) samples with OC43 being commonest (7/1.7%).

Co-detection with two or more pathogens was found in 161 samples (39.6%). Two pathogens were detected in 124 (30.5%) samples, three pathogens in 33 (8.1%) samples, four pathogens in 3 (0.7%) samples, and one sample was found to contain five pathogens (HRSV, HMPV, HRV, Mpp and BV from a three month old girl who subsequently died of respiratory failure). The commonest pathogens detected in co-detected samples were HAdV 85 (52.8%), HRSV 71 (44.1%), BV 67 (41.6%), HRV 43 (26.7%) and Mpp 31 (19.3%) with the most frequent combinations being HRSV/BV (26/16.1% of co-detections) and HRSV/HAdV 18 (11.2%). In contrast, the commonest

pathogens detected in single infections (n=187; 45.9% total samples) were HRSV 81 (43.3%) and HRV 34 (18.2%) with HAdV and BV comprising a much smaller percentage (16/8.6% and 9/4.8% respectively) [Figure 2].

Disease Severity

Overall, 23 (5.7%) children had very mild disease, 173 (42.5%) had mild disease, 169 (41.5%) had moderate disease and 42 (10.3%) had severe disease based on the criteria above. Most pathogens were represented within each of the disease severity groups, with prevalence being broadly similar. However, children with HRSV infection were more likely to have moderate than mild disease (43.2% vs 31.8%; $p=0.019$) compared to children without HRSV infection, whilst children with Mpp infection were more likely to have moderate (12.4%) or severe (16.7%) disease, than mild (6.4%) disease (mild vs moderate, $p=0.04$: mild vs severe, $p=0.039$).

When admission was used as a marker of disease severity, children with HRSV and Mpp infection were significantly more likely to be hospitalised than those without these infections (HRSV, 59.2% vs. 47.8%, $p=0.017$; Mpp, 70% vs. 53.6%, $p=0.012$). Conversely, those with any HPIV infection were less likely to need admission than those without (35.3% vs. 53.6%; $p=0.031$) although this association was not significant when individual HPIVs were studied.

The proportion of patients from whom no pathogen was detected or in whom co-detection was found, was not significantly different in any of the four disease severity groups studied or between those that were hospitalised.

Clinical Manifestation

Overall, 23 (5.7%) infants and preschoolers had as a discharge diagnosis URTI, 211 (51.8%) had bronchiolitis, 109 (26.8%) had pneumonia, 55 (13.5%) had EVW/asthma and 9 (2.2%) had another diagnosis (whooping cough, pneumonia with pleural effusion and bronchiolitis obliterans). Most pathogens were detected in each of the four main clinical disease groups with prevalence being broadly similar. Mpp and BV showed significant associations with particular conditions. Mpp infection was more commonly associated with pneumonia than bronchiolitis (13.8% of cases of pneumonia vs 7.1% of cases of bronchiolitis; $p=0.04$), and BV was more commonly associated with EVW/asthma than bronchiolitis (29.1% of EVW/asthma vs 14.7% of bronchiolitis; $p=0.013$). No other relationships between pathogens and particular conditions were found. The proportion of patients from whom no pathogen was detected or in whom co-detection was found, was not significantly different in any of the four clinical condition categories.

HRSV and Mpp were more commonly detected in those children requiring admission to hospital with bronchiolitis than in those who were discharged from A&E with the same condition (HRSV, Admitted, 48%; Not Admitted, 32%; $p=0.011$; Mpp, Admitted, 11%; Not Admitted, 3%; $p=0.014$). Mpp was detected in 17% of children who were admitted to hospital with pneumonia.

Temporal Patterns

HRSV, HMPV and Mpp exhibited strong seasonal patterns, with HRSV cases peaking over the rainy season in Recife and both HMPV and Mpp peaking soon afterwards [Figure 3]. HAdV, BV and HRV were all found to be endemic throughout

the year. These patterns were confirmed when monthly detection rates based on number of samples collected were analysed, apart from for BV, which showed a peak in October (data not shown). No significant influenza season was seen. In the year studied, different HPIVs circulated at different times of year.

Discussion

This study describes for the first time respiratory pathogen prevalence in different severities and clinical manifestations of ARI in infants and preschoolers from low-income families. Viral or atypical bacterial agents were detected in the majority with the commonest being HRSV, HAdV, HRV, HMPV, BV and Mpp. Overall, most pathogens were detected in similar proportions in all severities and clinical manifestations of ARI. However, HRSV was associated with more severe disease and particularly more severe cases of bronchiolitis. Similarly, Mpp was associated with more severe cases of pneumonia and importantly, was detected in 17% of infants and preschoolers admitted to hospital with pneumonia. Detection of two or more pathogens occurred in nearly 40% of children with ARI, with HRSV/HAdV and HRSV/BV co-detections being particularly common. Co-detection was not associated with more severe disease or with particular clinical manifestations of ARI.

We detected a viral or atypical bacterial pathogen in nasopharyngeal aspirates from 85.5% of children, a detection rate particularly high compared to similar studies on ARI (35-78%).^{16,18,22} We also found very high rates of co-detection. There are a number of different reasons for this. Firstly, our detection rates were always more likely to be higher because we looked for a wider range of pathogens than previous studies and included BV, a virus particularly prevalent in pre-school children.^{23,24} Secondly, the samples collected were all 'high quality' nasopharyngeal aspirates, collected prospectively by one person in a systematic fashion and processed rapidly. This contrasts with large retrospective studies, which often include multiple specimen types from different patient groups taken by medical personnel with varying amounts of

training.^{15,25} Indeed, a recent study on preschool children with ARI addressed just this issue and showed that pathogen detection by PCR was significantly higher in NPAs than nasal swabs.²⁶ Finally, living conditions may play a role in why we detected so many pathogens. The majority of the children recruited to this study came from low-income families living in urban favelas in Recife. The median number of children sharing a bedroom with the study participant was three with over a quarter of children sharing a bedroom with four or more people. It is well-known that overcrowded living conditions predispose to increased rates of infection and co-detection, presumably through greater human-pathogen contact.^{5,8}

The high prevalence of HAdV (24.7%) and BV (18.7%), particularly in co-detections, calls into question their clinical significance in this study of infants and preschoolers with ARI. Prolonged nasopharyngeal shedding or asymptomatic persistence of virus following infection might provide possible explanations for these findings given that HAdV shedding in faeces can go on for many months following acute infection²⁷ (although it is unknown whether this also occurs in the nasopharynx), and BV was recently found to persist in the upper airways of some children up to 2 months following acute infection.²⁸ However, while a high prevalence of BV has been reported before in similarly aged cohorts of children,^{14,29} the same cannot be said for adenovirus.¹⁵⁻¹⁷ A more likely explanation, certainly for HAdV, is that these findings again reflect overcrowded living environments. HAdV is a well-described cause of epidemic respiratory disease especially in crowded susceptible populations such as military trainees.³⁰ Viral load analysis could provide some clarity but multiple factors probably impact on respiratory viral shedding during an acute infection and including host immunological responses and time following inoculation to name but two.

Very few studies incorporate the full spectrum of disease severity from children with mild URTI to severe disease requiring oxygen. Our criteria were based on the presence or absence of lower respiratory tract signs, need for admission to hospital and need for oxygen. Over 80% of children in this study fell into mild (discharge + lower respiratory signs) or moderate (admitted + lower respiratory signs) categories, accurately reflecting the primary/secondary nature of the majority of ARI seen within our A&E department. Most pathogens were detected in all severities of disease, but children in whom HRSV and Mpp were detected were more likely to have moderate or severe disease than those infected with other viruses, respectively confirming and highlighting the importance of these pathogens in severe ARI in this age group. Another measure of disease severity is need for admission and interestingly, HRSV was detected in the nasopharynx of over 50% of infants admitted with bronchiolitis compared to only 30% of infants discharged with the same condition. Similarly Mpp was more likely to be detected in those children admitted with bronchiolitis with the same trend being seen in children admitted with pneumonia. The only other pathogens associated with a particular disease severity were the HPIVs, which were more likely to be associated with milder disease than severe disease. However, these viruses were analysed together as a group and no relationship was found for individual HPIVs.

In contrast with previous studies,^{19,31-33} co-detection overall was not associated with more severe disease. However this study was not powered to detect whether particular co-detection combinations were associated with disease severity. Similarly, no association was found between those children in whom no pathogen was detected (where one might speculate about infection with bacterial pathogens such as *Streptococcus* and *Haemophilus*) and disease severity. To properly assess the role of bacterial infection in this group of children is difficult given that access to the lower

respiratory tract is generally not possible and inferences based on nasopharyngeal carriage are complicated given that 25-40% of children are colonized with the common bacterial pathogens causing disease. The more widespread use of 16S ribosomal RNA gene sequencing technology may help determine the relationship between bacteria and viruses/atypical in ARI in the future.³⁴

Most respiratory viruses or atypical pathogens were detected in the four common clinical manifestations of ARI diagnosed. Furthermore the prevalence of these pathogens within these groups was broadly similar with two notable exceptions; Mpp with pneumonia and BV with EVW/Asthma. Although Mpp is a well-recognised cause of community acquired pneumonia in 5-15 year old children and adults, it is considered less common in infants and preschool children. Thus our findings that Mpp could be detected in approximately 10% of all children with ARI overall and 17% of cases of hospitalised pneumonia in this age-group could have implications for antibiotic guidelines given that the current recommendations for this age group do not include a macrolide antibiotic.³⁵

Mpp was also more commonly detected in co-detections than single infections, raising the possibility that its ability to cause clinical symptoms might be aided by a preceding or contemporaneous viral infection. Equally, this finding could also be coincidental given that the Mpp seasonal peak, which occurred soon after the rainy season in our study, overlapped with the peak prevalence period for a number of other viruses.

This study has a number of strengths and weaknesses. It examines the causes of ARI in the broadest sense from very mild coryzal symptoms to severe life threatening pneumonia. However, we did not investigate pathogen prevalence in asymptomatic children from the same population. Given that van der Zalm et al recently showed that

respiratory viruses (particularly HRV and HCoV) could be detected by PCR in 9-36% (depending on age) of respiratory samples from children when asymptomatic³⁶, this group would be of considerable interest. Equally, while we tested for more pathogens than most published studies, we did not test for all, with *Bordetella pertussis* being a notable exception, particularly in this age-group. Other valid criticisms include that multiplex PCR may be overly sensitive and that pathogen detection in the nasopharynx may not accurately reflect the situation in the lower respiratory tract. While neither criticism is limited to our study, we have tried to investigate the importance of our findings by putting them in the context of disease severity and clinical manifestation.

In summary, we have shown that respiratory viral or atypical bacterial infections can be readily detected in a population of infants and preschool children from predominantly low-income families with ARI in Brazil. Importantly, HRSV is more commonly detected in those children needing hospitalisation for bronchiolitis than those being discharged home and *Mycoplasma* is relatively commonly detected in the nasopharynx in preschool children hospitalised with pneumonia. This latter finding may have implications to future antibiotic guidelines.

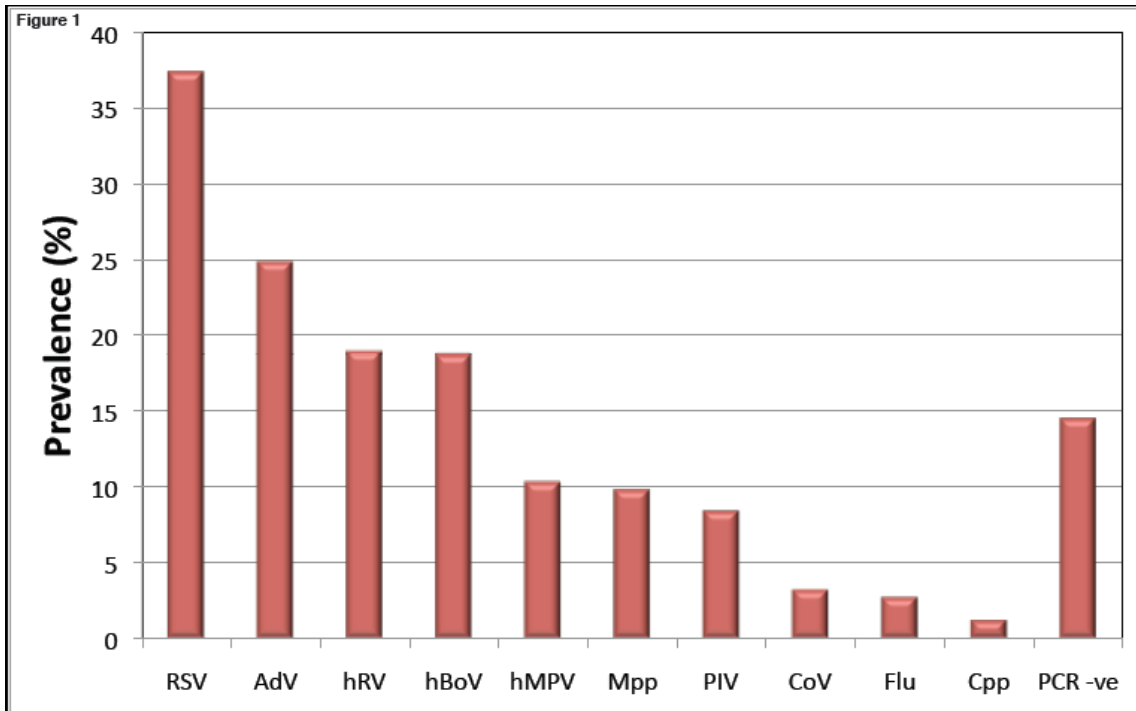


Figure 1. Pathogen prevalence(%) in nasopharyngeal aspirates from children less than five years with acute respiratory infection. Cumulative prevalence was greater than 100% because of co-detection.

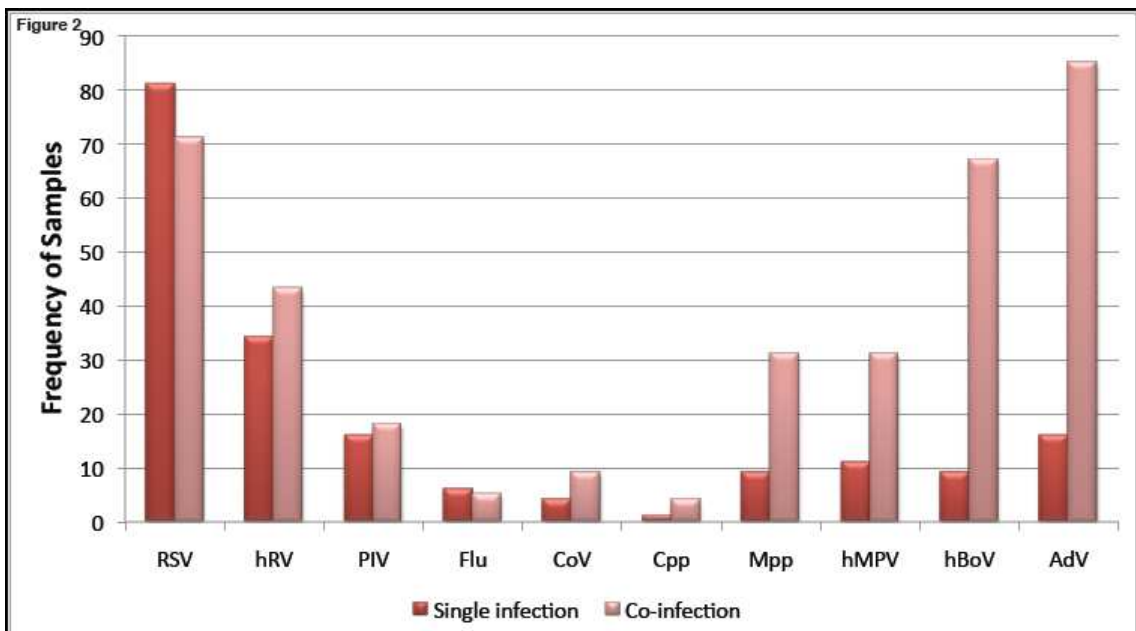


Figure 2. Pathogen frequency in singly infected (red) and co-detected (pink) nasopharyngeal aspirate samples from children less than five years with acute respiratory infection.

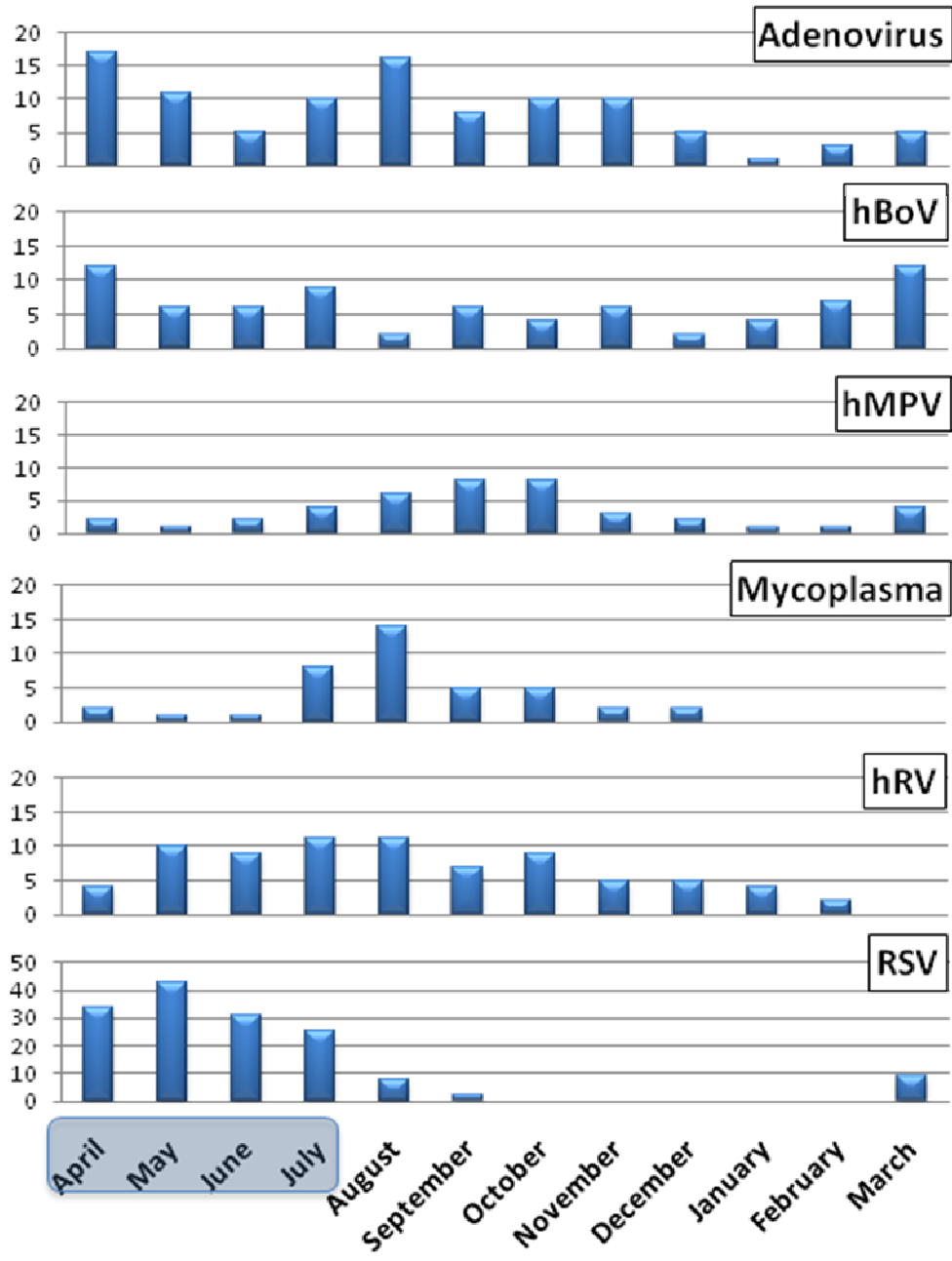


Figure 3. Temporal spread of the 6 most common infections. Shaded area denotes rainy season.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) grant number 479381/06-2, Fundo de Amparo a Pesquisa e Ensino do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (FAPE-IMIP) and Department of Child Health, University of Liverpool, Institute of Child Health, Alder Hey Children's Hospital, Liverpool, UK.

DECLARATIONS OF INTEREST

None.

References

1. Murray C, Lopez A. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349 (9063): 1436-42.
2. WHO. Leading Infectious Killers. *Infectious Disease Report 1998: World Health Organisation, 1999.*
3. Murray C, Lopez A. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349 (9064):1498-504.
4. Hinman A. Global progress in infectious disease control. *Vaccine* 1998; 16 (11-2):1116-21.
5. Simoes E. Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. *J Pediatr* 2003; 143 (5 Suppl): S118-26.
6. Peat J, Keena V, Harakeh Z, Marks G. Parental smoking and respiratory tract infections in children. *Paediatr Respir Rev* 2001; 2 (3): 207-13.
7. Chen Y, Li W, Yu S. Influence of passive smoking on admissions for respiratory illness in early childhood. *British Medical Journal Clinical Research Ed.* 1986; 293 (6542): 303-6.
8. Anderson L, Parker R, Strikas R, Farrar J, Gangarosa E, Keyserling H, et al. Day-care center attendance and hospitalization for lower respiratory tract illness. *Pediatrics* 1988; 82 (3): 300-8.
9. Williams B, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect Dis* 2002; 2 (1): 25-32.

10. van den Hoogen B, de Jong J, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier R, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7 (6): 719-24.
11. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink M, Vermeulen-Oost W, Berkhout R, Wolthers K, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004; 10 (4): 368-73.
12. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virol* 2007; 81 (7): 3051-7.
13. Allander T, Tammi M, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102 (36): 12891-6.
14. Cilla G, Oñate E, Perez-Yarza E, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. *J Med Virol* 2008; 80 (10): 1843-9.
15. Brunstein J, Cline C, McKinney S, Thomas E. Evidence from multiplex molecular assays for complex multipathogen interactions in acute respiratory infections. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (1): 97-102.
16. Sung R, Chan P, Tsen T, Li A, Lam W, Yeung A, et al. Identification of viral and atypical bacterial pathogens in children hospitalized with acute respiratory infections in Hong Kong by multiplex PCR assays. *J Med Virol* 2009; 81 (1): 153-9.
17. Regamey N, Kaiser L, Roiha H, Deffernez C, Kuehni C, Latzin P, et al. Viral etiology of acute respiratory infections with cough in infancy: a community-based birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27 (2): 100-5.
18. Kaplan N, Dove W, Abd-Eldayem S, Abu-Zeid A, Shamooh H, Hart C. Molecular epidemiology and disease severity of respiratory syncytial virus in relation to other potential pathogens in children hospitalized with acute respiratory infection in Jordan. *J*

Med Virol 2008; 80 (1): 168-74.

19. Semple M, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara P, Halfhide C, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005; 191 (3): 382-6.

20. Semple M, Booth J, Ebrahimi B. Most human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus in infant nasal secretions is cell free. *J Clin Virol* 2007; 40 (3): 241-4.

21. Pending submission: Hopkins M, Correia J, Hart I. Validation of a Six-Target Real-time PCR Assay to Assist in the Diagnosis of Viral Respiratory Illness. Liverpool, UK, 2010.

22. Bharaj P, Sullender W, Kabra S, Mani K, Cherian J, Tyagi V, et al. Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. *Virol J* 2009; 6: 89.

23. Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter G, Hallam N, Templeton K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis* 2006; 194 (9): 1283-90.

24. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro E, Ferguson D, Landry M, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006; 194 (9): 1276-82.

25. Weigl J, Puppe W, Meyer C, Berner R, Forster J, Schmitt H, et al. Ten years' experience with year-round active surveillance of up to 19 respiratory pathogens in children. *Eur J Pediatr* 2007; 166 (9): 957-66.

26. Meerhoff T, Houben M, Coenjaerts F, Kimpen J, Hofland R, Schellevis F, et al. Detection of multiple respiratory pathogens during primary respiratory infection: nasal swab versus nasopharyngeal aspirate using real-time polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29 (4): 365-71.
27. Fox J, Brandt C, Wassermann F, Hall C, Spigland I, Kogon A, et al. The virus watch program: a continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. VI. Observations of adenovirus infections: virus excretion patterns, antibody response, efficiency of surveillance, patterns of infections, and relation to illness. *Am J Epidemiol* 1969; 89 (1): 25-50.
28. Brieu N, Guyon G, Rodière M, Segondy M, Foulongne V. Human bocavirus infection in children with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27 (11): 969-73.
29. Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, Adams O. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27 (7): 589-94.
30. Russell K, Broderick M, Franklin S, Blyn L, Freed N, Moradi E, et al. Transmission dynamics and prospective environmental sampling of adenovirus in a military recruit setting. *J Infect Dis* 2006; 194 (7): 877-85.
31. Foulongne V, Guyon G, Rodière M, Segondy M. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25 (4): 354-9.
32. Greensill J, McNamara P, Dove W, Flanagan B, Smyth R, Hart C. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* 2003; 9 (3): 372-5.

33. König B, König W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (10): 4632-5.
34. Patel J. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 2001; 6 (4): 313-21.
35. Committee BTSSoC. British Thoracic Society Guidelines for the Management of Community Acquired Pneumonia in Childhood. *Thorax* 2002; 57 Suppl 1: 1-24.
36. van der Zalm M, van Ewijk B, Wilbrink B, Uiterwaal C, Wolfs T, van der Ent C. Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. *J Pediatr* 2009; 154 (3): 396-400.

4.2. Artigo 2

Title

Risk factors for viral acute respiratory infections hospitalizations in infants and preschoolers in Recife, Brazil.

Authors

Patrícia GM Bezerra^{1,2}, Murilo CA Britto^{1,2,*}, Maria do Carmo MB Duarte¹, Luis E Cuevas³, Katie Rose⁴, Angela Fonceca⁴, Mark Hopkins⁵, Charles A Hart⁵, Paul S McNamara⁴, Jailson B Correia^{1,6}

Affiliations:

¹Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil

²Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, Brazil

³UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), Geneva, Switzerland

⁴Institute of Child Health, University of Liverpool, Alder Hey Children's Hospital, Liverpool, UK.

⁵Department of Medical Microbiology, University of Liverpool, Liverpool, UK.

⁶Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil

*Corresponding author.

Abstract

Objectives

Acute respiratory infections (ARI) cause a high burden of disease in both developed and developing countries. The aim of this study was to identify risk factors for hospital admissions in infants and preschoolers with PCR-confirmed viral ARI.

Setting

Pediatric department of a publically funded teaching hospital.

Methods

Prospective cross sectional study. Infants and preschoolers with PCR-confirmed ARI for 15 respiratory pathogens in nasopharyngeal aspirates were enrolled from April 2008 to March 2009. Data were analyzed using multivariate logistic regression.

Results

Of the 303 participants, 152 (38.8%) were hospitalized and the median age was 11 months. Five risk factors for hospitalization were identified: birth weight < 2500g (OR = 6.44; 95% CI: 1.93 to 21.51), mothers aged less than 21 years (OR = 7.19, 95% CI: 1.21 to 42.78), low paternal education (OR = 7.24, 95% CI: 2.93 to 17.87), disease occurring between June to November (OR = 6.85, 95% CI: 1.78 to 26.09), and pneumonia diagnosis (OR = 42.45, 95% CI: 6.43 to 280.25).

Conclusions

Knowledge on the above mentioned risk factors for hospitalization due to PCR-

confirmed ARI may inform both clinical and public health planning decisions in similar referral hospitals.

Key words: respiratory tract infections, risk factors, infant, Brazil, respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, human adenovirus, human bocavirus, rhinovirus, parainfluenza virus, preschool, hospitalization.

Introduction

Every year, about 4 million children die from acute respiratory infection (ARI) and half of such deaths occur in infants less than six months old.¹ Viruses are major contributors to the burden of ARI disease. Respiratory syncytial virus (HRSV) alone is estimated to cause 3.4 million hospital admissions and between 66,000 to 199,000 deaths worldwide annually.^{2,3} In recent years, polymerase chain reaction (PCR) methods have changed our knowledge of ARI epidemiology, outlining the role played by other viruses such as human metapneumovirus (HMPV), human coronavirus (HCoV) and human bocavirus (BV).⁴⁻⁶

The risk of ARI acquisition has been studied in economically developed and developing settings. Factors such as having older siblings, attending a child care center, exposure to passive smoking and living in crowded housing conditions have been associated with a higher risk.⁷ In developing countries, low access to vaccination, low socioeconomic status,⁸ malnutrition and reduced access to health care facilities were also shown to increase risk of ARI acquisition.⁹⁻¹¹

Although most viral respiratory infections in infants and preschool children are benign and self-limited, risk factors for severity markers, such as hospital admission, have been previously described. These include prematurity, low birth weight, age less than three months, chronic pulmonary or severe congenital heart disease, neurological conditions and immunodeficiencies.^{12,13,14,15} These studies have often focused on clinically diagnosed bronchiolitis and pneumonia or have only looked at a single pathogen, such as HRSV.

The aim of this study was to identify risk factors for ARI-associated hospital admissions in infants and preschool children in Recife, Brazil, with PCR-confirmed

ARI, where multiple pathogens were simultaneously tested.

Method

A prospective cross sectional study was conducted at the Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) in Recife, Northeastern Brazil. IMIP is a referral teaching hospital and provides secondary and tertiary medical care to predominantly low-income families, but also receives self reported patients from Pernambuco and neighboring states within the National Unified Health System (SUS) of Brazil.

This risk factor study is an arm of an active enhanced surveillance project. Infants and preschool children presenting with respiratory symptoms were consecutively enrolled (weekdays, 7 am to 3 pm) from April 2008 to March 2009.

We used a convenience sample, calculated in 500 participants. This sample size was sufficient to detect increases in risk (odds ratio) of 1.8, with a 20% proportion of hospitalization in non-exposed, an alpha error of 5% and a beta error of 20%. The study included all participants with ARI whose PCR of nasopharyngeal aspirates (NPA) were positive for one or more of 15 viruses tested. Patients who tested positive for *Mycoplasma pneumoniae* (Mpp) or *Chlamydomphila pneumoniae* were excluded. Children suffering from chronic pulmonary diseases and /or severe heart diseases were excluded. Patients were followed up daily until discharge and their medical records were reviewed for complementary information. The variables investigated were: family income, housing conditions, parental characteristics, number of persons per room in the house, smoking exposure, number of younger and older siblings, birth weight, history of prematurity, history of breastfeeding, history of allergy and other diseases, previous occurrence of pneumonia and wheezing, immunization status, feeding acceptance,

respiratory symptoms, z score for weight and height (according to WHO standards), vital signs, chest indrawing, cyanosis and transcutaneous oxygen saturation.

Discharge diagnoses were reviewed by investigators and consensually categorized according to *a priori* definitions. *Bronchiolitis* was defined as viral illness in children less than 18 months, characterized by previous signs and symptoms of upper respiratory infection, followed by respiratory distress, in which wheezing may be present. *Pneumonia* was defined as an acute respiratory illness associated with tachypnea and or intercostal retractions in a patient with focal or diffuse crackles, or decreased vesicular sounds, in the presence or not of radiological confirmation. *Episodic viral wheeze (EVW)* was defined as wheezing during discrete time periods, often in association with clinical evidence of a viral cold, with absence of wheeze between episodes.¹⁶ *Acute URTI* was defined as an acute viral illness in children characterized by the presence of general and respiratory signs and symptoms, including fever, coryza, dry or productive cough, and in which tachypnea, intercostal retractions and stridor may be present.

Disease severity was assessed at the time of recruitment and was categorized as follows: very mild (upper respiratory tract symptoms not needing hospital admission); mild (lower respiratory tract symptoms but not needing hospital admission); moderate (upper and/or lower respiratory tract symptoms needing hospital admission but not oxygen supplementation) and severe (upper and/or lower respiratory tract symptoms needing hospital admission and oxygen supplementation).

The hospital Research Ethics Committee approved the protocol. Parents and guardians gave written consent and provided socio-demographic and clinical data on admission.

Nasopharyngeal aspirate (NPA) samples were obtained soon after first medical assessment or within the first 24 hours of admission. After centrifugation, the supernatant was removed and frozen at -70°C until transported to the Department of Medical Microbiology of the University of Liverpool, United Kingdom. RNA/DNA were extracted from each sample using the QIA symphony Mini Kit (Pathogen Complex 200 protocol). Five different Multiplex RT-PCR (LightCycler 480 Real-Time PCR System, Roche) assays were used to detect 17 bacterial and viral respiratory pathogens: influenza A (FLUAV), influenza B (FLUBV), HMVP, HRSV, HCoV (OC43, NL63, 229E and HKU), parainfluenza virus types 1, 2, 3 and 4 (HPIV1-4), HRV, adenovirus (HAdV), Mpp and *C. pneumoniae*, and BV.

The data entry, its validation and statistical analysis were performed using the SPSS statistical package version 9.0.0. Pearson chi-square and Fisher exact tests were used in bivariate analysis. Variables with a p value of < 0.25 were included in multivariate analysis model. Logistical regression analysis was performed with the stepwise/backwise method, considering a significant p value < 0.05 for the final model. Interaction among variables was tested and so was the model adjustment, through the Hosmer & Lemeshow test.

Results

A total of 303 children with positive PCR for viral pathogens were included in this study. Of 303 children, 152 (50.2%) were hospitalized: 79 (52%) for bronchiolitis, 59 (38.8%) for pneumonia, 11 (7.2 %) for EVW and 3 (2%) for URTI (viral croup). Of the 303 children investigated, 166 (54.8%) were male, with a median age of 11 months. The prevalence of co-morbidity in the sample population investigated was 4%, and included minor congenital heart defect, neurological and genetic diseases. The median of breastfeeding length was three months. In 132 (43.6%) of the subjects investigated, there was at least one smoker at home. The average number of people sharing the same bedroom with the child was three. Average (SD) per capita income was US\$81.14 (71.84). The nine years of compulsory education had not been completed by 175 (58%) of mothers and 165 (54.7%) of fathers. The results of bivariate analysis and of the logistical regression model are shown in Table 1. The type of virus found was not a risk factor for hospitalization (crude OR 0.93; 95% CI: 0.72 to 1.19). In the final model, the following risk factors for hospitalization are shown: birth weight less than 2500 g, mother's age, father's schooling, disease taking place in the period of June to November, and pneumonia diagnosis. There was interaction of per capita income with previous wheezing and mother's age with the month in which infection took place. The Hosmer and Lemeshow test showed a good adjustment of the model with significance equal to 0.681.

Discussion

Here we report that low birth weight (<2500 g), mother's age, father's schooling, disease occurring between June and November, and a clinical diagnosis of pneumonia were risk factors for hospitalization during an ARI episode in a referral centre in urban Northeast Brazil.

Low birth weight has been found to be associated with an increased risk of hospitalization in studies that assessed lower ARI without pathogen identification.^{17, 18} Low birth weight children tend to have poor immune response and reduced diameter of the airways.^{17, 19} On the other hand, we found no significant association between prematurity or breastfeeding and hospital admission. Prematurity has been previously described as a risk factor for hospitalization by ARI (and HRSV bronchiolitis), due to the immaturity of the respiratory system and insufficient transplacental transfer of maternal antibodies against HRSV.²¹⁻²² Considering that we relied on parental information on gestational age, thus likely to be less accurate than information on birth weight (usually recorded in the child's health card), this may have hindered the interpretation of this finding. In contrast, breastfeeding is a well known protective factor against serious diseases, especially in developing countries.²³⁻²⁵ However, we found no such protective effect in our study, perhaps because the short median length of breastfeeding in our population made such protection ineffective.

We found no association between gender or age and risk of hospital admission. An increased risk of severe disease has been previously described in boys (as compared to girls), and a decrease in lung function of male infants has been suggested, although no clear explanation has been agreed in the literature.^{26, 27} On the other hand, a higher risk of severe ARI has been described in infants under the age of six months,²⁸ and the

absence of maternal antibodies, narrowed airways, immature immune system, and altered immune response against viruses such as HRSV were implied as mechanisms.²⁹ However, our results showed no statistically significant association between age and risk of hospital admission, even when different age strata were analyzed (data not shown). The lack of association between hospital admission and gender or age was not an expected result. In this setting, gender discrimination is less likely to be a problem. We may speculate that patterns of referral may play a role and that infants and preschool children in our study may have presented within a more severe spectrum of disease than in previous reports, as demonstrated by a high admission rate (nearly 50%).

These issues may have also explained the finding of a clinical diagnosis of pneumonia was associated with an increased risk of hospital admission. Although the highest proportion of hospitalization was due to bronchiolitis, the greatest risk for hospitalization is by pneumonia. This possibly reflects that children with pneumonia admitted to IMIP may have a more severe infection or have failed to respond to treatment at another facility, or have delayed medical care. Moreover, although hospital admission is usually accepted as a good proxy of severity, the perception of severity and need of hospital admission may vary according to setting. For instance, doctors in Recife may consider less safe to treat cases of pneumonia as outpatients whereas cases of bronchiolitis could get less attention than in other regions.

We found that mother's young age and father's low level of schooling were associated with an increased risk of hospital admission. These results are consistent with findings from south and southeastern Brazil.³⁰⁻³² In low income settings, younger mothers may feel more anxious and less capable of caring for their children, whereas older, more experienced mothers may identify the severity of the disease better and seek medical assistance sooner, besides being able to provide better care for their children's

health.^{26, 31, 32} Low paternal level of schooling was found to be associated with hospitalization risk and this has been described as a good proxy for family income.¹⁹ However, income itself did not show a statistically significant association with hospitalization in our study, perhaps due to the inherent difficulties to measure income from varied informal sources in this setting. Of interest, regression analysis showed interaction between per capita's family income and history of previous wheezing, as well as between maternal age and month of occurrence of infection. We found no plausible explanations for these interactions.

Despite the high percentage of household smoking (about 50%), there was no statistically significant association between smoking and the risk of hospitalization. This does not agree with most studies that show higher respiratory morbidity, especially among children who live with their smoking mothers.^{9, 33} We did not investigate which family member smokes or whether they smoked at home or elsewhere. Furthermore, we can speculate that since Recife and neighboring cities have a warm and stable average temperature, homes might be more ventilated than those in less warmer climates, which favors the elimination of air contaminated with tobacco smoke.

The morbidity associated to HRSV infection has been well established in infants with bronchiolitis and recent studies have also been highlighted other respiratory viruses such as HRV and HMPV as isolated agents or in association with HRSV on that morbidity.³⁴ However, the type of virus in this study was not a risk factor for hospitalization, even when only children under 24 months old were selected.³⁴⁻³⁶ Only a proportion of infants infected by HRSV need hospitalization and the presence of the virus itself does not always account for differences in disease severity.³⁵ It is possible that genetic conditions of the study population,³⁷ or other environmental conditions (household crowding, exposure to smoking, environmental pollutants), may interfere in

the agent/host relation, minimizing the risk in our population.^{10, 17, 38}

Of interest, we found a higher risk of hospital admissions from June to November, thus only partially coincident with the HRSV season (which occurs between April and July). We speculate that operational reasons may explain this finding as during this time a new triage system was introduced in the hospital thus potentially reducing the proportions of mild cases during data collection.

There are inherent limitations in this referral hospital-based cross-sectional study. Recall and selection biases could not be completely ruled out. As to confounding factors during research-planning stages, an attempt was made to include enough variables so that, through an appropriate statistical analysis, such factors could be assessed and corrected for. Furthermore, despite limitations, few other studies have addressed risk factors for ARI-associated hospital admissions in infants and preschool children with PCR-confirmed ARI, where multiple pathogens were simultaneously tested. Knowledge on the above mentioned risk factors for hospitalization due to PCR-confirmed ARI may inform both clinical and public health planning decisions in similar referral hospitals. Prospective longitudinal studies are needed to further clarify associations with biological and environmental conditions and to further elucidate such relationships.

Table 1 – Distribution of risk factors for hospitalization by viral ARI in infants and preschoolers at IMIP, Brazil. April 2008 to March 2009.

Variables	Crude OR (IC 95%)	Adjusted OR (IC 95%)
Age (months)	p = 0.000	p = 0.207
<=3	4.60 (2.04-10.41)	2.17 (0.45-10.44)
4 – 6	1.80 (0.79-4.09)	0.99 (0.21-4.67)
7 – 12	0.96 (0.43-2.11)	1.56 (0.35-6.93)
13 – 24	0.97 (0.43-2.19)	0.54 (0.15-1.96)
>25	1.00	1.00
Birth weight (g)	p = 0.001	p = 0.002
< = 2500	0.32 (0.15-0.64)	6.44 (1.93-21.51)
> 2501	1.00	1.00
Breastfeeding duration (months)	p = 0.040	p = 0.423
< = 3	1.61 (0.79-3.29)	2.27 (0.67-7.69)
4 – 6	0.59 (0.20-1.70)	2.04 (0.45-9.29)
> 7	1.00	1.00
Mother's age (years)	p = 0.15	p = 0.03*
< = 21	0.69 (0.43-1.14)	7.19 (1.21-42.78)
Mother's schooling (years)	p = 0.002	p = 0.435
< = 4	3.22 (1.62-6.37)	1.73 (0.52-5.78)
5 – 8	1.78 (1.07-2.98)	1.59 (0.74-3.45)
> 9	1.00	1.00
Father's age (years)	p = 0.12	p = 0.707
< = 21	0.58 (0.29-1.15)	0.81 (0.27-2.41)
Father's schooling (years)	p = 0.002	p = 0.000
< = 4	1.75 (0.85-3.63)	3.18 (0.92-10.99)
5 – 8	2.64 (1.54-4.52)	7.24 (2.93-17.87)
> 9	1.00	1.00
Per capita income (US\$)	p = 0.023	p = 0.244*
< = 63.39	1.66 (0.89-3.08)	0.40 (0.11-1.49)
63.40 – 126.77	0.83 (0.43-1.59)	0.34 (0.09-1.22)
> 126.78	1.00	1.00
Previous wheezing	p = 0.000	p = 0.356*
Yes	0.28 (0.17-0.45)	2.07 (0.44-9.79)
Asthma referred by doctor	p = 0.22	p = 0.71
Yes	1.53 (0.77-3.02)	0.83(0.31-2.23)
Fever	p = 0.052	p = 0.036
Yes	1.68 (0.99-2.84)	0.38 (0.16-0.94)
Weight for age malnutrition	p = 0.072	p = 0.266
Yes	0.47 (0.20-1.09)	0.49 (0.14-1.71)
Height for age malnutrition	p = 0.002	p = 0.462
Yes	0.42 (0.24-0.74)	1.39 (0.58-3.33)
Taquipnea	p = 0.135	p = 0.051
Yes	1.44 (0.89-2.31)	0.45 (.02-1.00)
Chest indrawing	p = 0.024	p = 0.160
Yes	0.44 (0.21-0.91)	0.39 (0.11-1.45)
Diagnosis	p = 0.000	p = 0.000
Upper ARI	1.00	1.00
Episodic viral wheeze	1.95 (0.477-8.04)	3.24 (0.43-24.21)
Bronchiolitis	4.96 (1.39-17.66)	4.65 (0.79-27.11)
Pneumonia	15.73 (4.15-59.68)	42.45 (6.43-280.25)
Month of diagnosis	p = 0.000	p = 0.000*
December to February	1.00	1.00
March to May	2.83 (1.01-7.9)	0.16 (0.03-0.86)
June to August	22.53 (7.61-66.73)	0.49 (0.17-1.46)
September to November	4.83 (1.61-14.45)	6.85 (1.78-26.09)

* Interaction: per capita income with history of previous wheezing and mother's age with month of diagnosis.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) grant number 479381/06-2, Fundo de Amparo a Pesquisa e Ensino do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (FAPE-IMIP) and Department of Child Health, University of Liverpool, Institute of Child Health, Alder Hey Children's Hospital, Liverpool, UK.

DECLARATIONS OF INTEREST

None.

References

1. Moccia P, Anthony D, Brazier C. Situação mundial da infância edição especial. New York: Unicef; 2009.
2. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med.* 2009; 360 (6): 588-98.
3. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2010; 375 (9725): 1545-55.
4. Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr.* 2009; 98 (1): 123-6.
5. Garbino J, Gerbase MW, Wunderli W, et al. Lower respiratory viral illnesses: improved diagnosis by molecular methods and clinical impact. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170 (11): 1197-1203.
6. Midulla F, Scagnolari C, Bonci E, Pierangeli A, Antonelli G, De Angelis D, et al. Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants. *Arch Dis Child.* 2010; 95 (1): 35-41.
7. McConnochie KM, Roghmann KJ. Parental smoking, presence of older siblings, and family history of asthma increase risk of bronchiolitis. *Am J Dis Child.* 1986; 140 (8): 806-12.
8. Victora CG, Smith PG, Barros FC, Vaughan JP, Fuchs SC. Risk factors for deaths due to respiratory infections among Brazilian infants. *Int J Epidemiol.* 1989; 18 (4): 918-25.

9. Prietsch SO, Fischer GB, Cesar JA, Fabris AR, Mehanna H, Ferreira TH. Doença aguda das vias aéreas inferiores em menores de cinco anos: influência do ambiente doméstico e do tabagismo materno. *J Pediatr (Rio J)*. 2002; 78(5): 415-22.
10. Cardoso MR, Cousens SN, de Góes Siqueira LF, Alves FM, D'Angelo LA. Crowding: risk factor or protective factor for lower respiratory disease in young children? *BMC Public Health*. 2004; 3(4): 19.
11. Vázquez ML, Mosquera M, Cuevas LE, González ES, Veras ICL, Luz EO, et al. Incidência e fatores de risco de diarreia e infecções respiratórias agudas em comunidades urbanas de Pernambuco, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 1999; 15 (1): 163-71.
12. Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr*. 2003; 143: S112-7.
13. Thorburn K. Pre-existing disease is associated with a significantly higher risk of death in severe respiratory syncytial virus infection. *Arch Dis Child*. 2009; 94 (2): 99-103.
14. Simoes EAF. Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. *J Pediatr*. 2003; 143: S118-26.
15. Pezzotti P, Mantovani J, Benincori N, Mucchino E, Di Lallo D. Incidence and risk factors of hospitalization for bronchiolitis in preterm children: a retrospective longitudinal study in Italy. *BMC Pediatr*. 2009; 10 (9): 56.
16. Brand PL, Baraldi E, Bisgaard H, Boner AL, Castro-Rodriguez JA, Custovic A, et al. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. *Eur Respir J*. 2008; 32 (4): 1096-110.
17. Murray CS, Pipis SD, McArdle EC, Lowe LA, Custovic A, Woodcock A. Lung function at one month of age as a risk factor for infant respiratory symptoms in a high risk population. *Thorax*. 2002; 57 (5): 388-92.

18. Fischer GB, Teper A, Colom AJ. Acute viral bronchiolitis and its sequelae in developing countries. *Paediatr Respir Rev.* 2002; 3(4): 298-302.
19. Albernaz EP, Menezes AM, César JA, Victora CG, Barros FC, Halpern R. Risk factors associated with hospitalization for bronchiolitis in the post-neonatal period. *Rev Saude Publica.* 2003; 37 (4): 485-93.
20. Prietsch SO, Fischer GB, César JA, Lempek BS, Barbosa LV Jr, Zogbi L, et al. Acute lower respiratory illness in under-five children in Rio Grande, Rio Grande do Sul State, Brazil: prevalence and risk factors. *Cad Saude Publica.* 2008; 24 (6): 1429-38.
21. Koehoorn M, Karr CJ, Demers PA, Lencar C, Tamburic L, Brauer M. Descriptive epidemiological features of bronchiolitis in a population-based cohort. *Pediatrics.* 2008; 122 (6): 1196-1203.
22. Ogilvie MM, Vathenen AS, Radford M, Codd J, Key S. Maternal antibody and respiratory syncytial virus infection in infancy. *J Med Virol.* 1981; 7 (4): 263-71.
23. Wong DT, O.P., Neonatal respiratory syncytial virus infection: role of transplacentally and breast milk-acquired antibodies. *J Virol.* 1986; 57(3): 1203-1206.
24. César JA, Victora CG, Barros FC, Santos IS, Flores JA. Impact of breast feeding on admission for pneumonia during postneonatal period in Brazil: nested case-control study. *BMJ.* 1999; 318 (7194): 1316-1320.
25. Bachrach VR, Schwarz E, Bachrach LR. Breastfeeding and the risk of hospitalization for respiratory disease in infancy: a meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2003; 157 (3): 237-43.
26. Benício MH, Ferreira MU, Cardoso MR, Konno SC, Monteiro CA. Wheezing conditions in early childhood: prevalence and risk factors in the city of São Paulo, Brazil. *Bull World Health Organ.* 2004; 82 (7): 516-22.

27. Macedo SEC, Menezes AMB, Post P, Albernaz E, Knorst M. Respiratory syncytial virus infection in children under one year of age hospitalized for acute respiratory diseases in Pelotas, RS. *J Pneumol.* 2003; 29(1): 4-8.
28. Iwane MK, Edwards KM, Szilagyi PG, Walker FJ, Griffin MR, Weinberg GA, et al. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. *Pediatrics.* 2004; 113 (6): 1758-64.
29. Simoes EAF. Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. *J Pediatr.* 2003; 143: S118-26.
30. Victora CG, Fuchs SC, Flores JA, Fonseca W, Kirkwood B. Risk factors for pneumonia among children in a Brazilian metropolitan area. *Pediatrics.* 1994; 93 (6): 977-85.
31. Nascimento LFC, Marcitelli R, Agostinho FS, Gimenes CS. Hierarchical approach to determining risk factors for pneumonia in children. *J Bras Pneumol.* 2004; 30 (5): 445-51.
32. Victora CG, Huttly SRA, Barros FC, Vaughn JP. Maternal education in relation to early and late child health outcomes: findings from a Brazilian cohort study. *Soc Sci Med.* 1992; 34: 899-906.
33. Gonçalves-Silva RM, Valente JG, Lemos-Santos MG, Sichieri R. Tabagismo no domicílio e doença respiratória em crianças menores de cinco anos. *Cad Saúde Pública.* 2006; 22 (3): 579-86.
34. Paranhos-Baccalà G, Komurian-Pradel F, Richard N, Vernet G, Lina B, Floret D. Mixed respiratory virus infections. *J Clin Virol.* 2008; 43(4): 407-10.

35. Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, Le Roux P, Deschildre A, Forget C, et al. In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. *PLoS One*. 2009; 4 (2): e4596.
36. Miron D, Srugo I, Kra-Oz Z, Keness Y, Wolf D, Amirav I, et al. Sole pathogen in acute bronchiolitis: is there a role for other organisms apart from respiratory syncytial virus? *Pediatr Infect Dis J*. 2010; 29 (1): e7-10.
37. Janssen R, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers HM, Ermers MJ, Doornbos G, et al. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *J Infect Dis*. 2007; 196 (6): 826-34.
38. Dherani M, Pope D, Mascarenhas M, Smith KR, Weber M, Bruce N. Indoor air pollution from unprocessed solid fuel use and pneumonia risk in children aged under five years: a systematic review and meta-analysis. *Bull World Health Organ*. 2008. 86 (5): 390-98C.

V. CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1. Importância

As IRA são alvo de pesquisas em vários países. A morbidade e mortalidade por elas impostas fazem com que organizações internacionais, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), estimulem a identificação dos agentes patógenos associados às IRA, assim como a identificação de fatores de risco para a aquisição e/ou gravidade dessas infecções, proporcionando ações preventivas e terapêuticas adequadas às realidades de cada país. Alguns estudos têm ajudado a definir patógenos associados a essas infecções, porém ainda existem grandes lacunas no conhecimento sobre vários agentes envolvidos, principalmente nas pneumonias virais.

Desde a introdução da técnica de PCR, um método de clonagem *in vitro* proposto por Kary Mullis em 1985,³³ rápidos avanços têm revolucionado a prática da biologia molecular. Nos últimos 10 anos, a importância dos agentes etiológicos virais nas IRA tem sido destacada com a descoberta dos metapneumovírus, novos coronavírus (NL63 e HKU1) e bocavírus humano. Com o avanço das técnicas de PCR que permitem testar múltiplos organismos usando o Multiplex PCR, tem sido possível elucidar o verdadeiro papel dos agentes virais nas IRA, a presença de co-infecções entre os vírus ou entre vírus e bactérias. Entretanto, o significado clínico e o impacto desse conhecimento sobre a morbidade e mortalidade das IRA ainda precisa ser esclarecido. Essa foi uma das principais motivações para o desenvolvimento da presente pesquisa, além do escasso conhecimento sobre a epidemiologia viral, de Mpp e *C. pneumoniae* em Recife.

No primeiro artigo, tivemos a oportunidade de explorar pela primeira vez o comportamento epidemiológico de 17 patógenos respiratórios em Recife, através de

Multiplex PCR, durante o período de um ano em lactentes e pré-escolares com diferentes gravidades e manifestações clínicas de IRA, usuárias do SUS. Apesar de se tratar de estudo de base hospitalar, ele se torna um marco inicial para efeito de comparação com os outros estudos publicados no Brasil.

Agentes virais e bacterianos atípicos foram detectados na maioria das crianças, sendo os mais comuns: HVSR, HAdV, HRV, HMPV, BV e Mpp. Foi importante constatar que o HVSR, além de mais frequente, foi o agente associado com doença mais grave e particularmente com os casos mais graves de bronquiolite. Observou-se também um forte comportamento temporal, isto é, os casos de VSR foram mais frequentes nos meses de chuva de Recife. Outro dado importante foi a detecção do Mpp em lactentes e pré-escolares e sua associação com internamento e casos mais graves de pneumonia. Além disso, constatou-se que esse agente, juntamente com o metapneumovírus, também apresenta um comportamento temporal, isto é, eles são mais frequentes logo após a estação chuvosa de Recife. A detecção de dois ou mais patógenos foi comum e não se encontrou associação com doença mais grave ou alguma manifestação particular de IRA.

No segundo artigo exploramos a existência de potenciais fatores de risco para hospitalização por IRA viral. As publicações sobre o assunto no Brasil são baseadas apenas no diagnóstico clínico de bronquiolite ou pneumonia, ou baseados em resultados de imunofluorescência ou em faixas etárias variadas. A oportunidade de se verificar fatores de risco para hospitalização em lactentes e pré-escolares com um espectro maior de diagnósticos clínicos e com diagnóstico dos vírus confirmado por PCR é inédita no país. Os sete fatores de risco encontrados nesse estudo não foram muito diferentes dos já apontados em outros estudos, e a maioria está relacionada às condições ambientais e biológicas da população: baixo peso ao nascimento, mães jovens, baixa escolaridade

paterna, a IRA ocorrendo no período de Junho a Novembro, e diagnóstico de pneumonia.

5.2. Aplicabilidade

- Contribui para o conhecimento regional da epidemiologia de vírus respiratórios, *Mycoplasma pneumoniae* e *C. pneumoniae*.

- Permite comparações com outros estudos nacionais quanto à frequência desses agentes, sua distribuição temporal e associação ou não com diferentes manifestações de IRA ou gravidade de doença;

- Em relação ao vírus sincicial respiratório:

- Confirma seu relevante papel como agente causador de doença respiratória grave e motivo para hospitalização;

- Sua distribuição sazonal permite maior preparação dos serviços de saúde para maior demanda por assistência médica; possibilita a programação da administração de anticorpo monoclonal humanizado contra o HVSR em grupos de pacientes de risco de aquisição do HVSR (prematuros, cardiopatas, pneumopatas);

- Reforça a importância dos serviços de saúde realizarem o diagnóstico rápido de HVSR em crianças de risco e em casos de IRA que exijam hospitalização; esse conhecimento permite a instituição de medidas de isolamento de contato e respiratório, principalmente em unidades neonatais, onde os surtos por HVSR são comuns e com elevada letalidade;

- Em relação ao *Mycoplasma pneumoniae*:

- Novas pesquisas são necessárias para reproduzir os achados e esclarecer a necessidade da incorporação de terapêutica antimicrobiana específica (macrolídeos) na faixa etária pré-escolar;

- Em relação aos demais patógenos:

- Confirma o conhecimento que as co-infecções são comuns nas IRA e estimula novas pesquisas para elucidar a relevância clínica desse achado;

- Evidencia a baixa prevalência do vírus influenza na população estudada;

- Estimula novas pesquisas envolvendo maior quantidade de vírus e bactérias;

- Em relação aos fatores de risco:

- A identificação de fatores de risco para hospitalização subsidia os pediatras a identificarem os pacientes de risco e traçarem planos terapêuticos específicos;

- Aplicabilidade em médio e longo prazo:

- A pesquisa em cooperação com centros mais avançados proporciona o intercâmbio de conhecimentos e aproxima a pesquisa de bancada com a prática clínica.

- Norteia os laboratórios para a produção de métodos diagnósticos para os vírus mais comuns e para o desenvolvimento de vacinas.

VI. CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moccia P, Anthony D, Brazier C. Situação mundial da infância edição especial. New York: Unicef; 2009.
2. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med.* 2009; 360 (6): 588-98.
3. Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr.* 2009; 98 (1): 123-6.
4. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2010; 375 (9725): 1545-55.
5. Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2: 25-32.
6. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet.* 2005; 365 (9465): 1147-52.
7. Datasus, Brasil: Ministério da Saúde Indicadores e Dados Básicos Brasil 2008. 2010 [acesso em: 30 mai. 2010]. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>.
8. NEPI, Núcleo de Epidemiologia do IMIP, 2008.
9. SIM, Sistema de Informação sobre Mortalidade, IMIP. 2008.

10. Benguigui Y. Controle das infecções respiratórias agudas: implementação, acompanhamento e avaliação. HCT/AIEPI - 6.P. Washington: Organização Panamericana de Saúde; 1997.
11. Victora CG, Smith PG, Barros FC, Vaughan JP, Fuchs SC. Risk factors for deaths due to respiratory infections among Brazilian infants. *Int J Epidemiol.* 1989; 18 (4): 918-25.
12. Albernaz EP, Menezes AM, César JA, Victora CG, Barros FC, Halpern R Risk factors associated with hospitalization for bronchiolitis in the post-neonatal period. *Rev Saude Publica.* 2003; 37 (4): 485-93.
13. Macedo SEC, Menezes AMB, Post P, Albernaz E, Knorst M. Respiratory syncytial virus infection in children under one year of age hospitalized for acute respiratory diseases in Pelotas, RS. *J Pneumol.* 2003; 29 (1): 4-8.
14. Prietsch SO, Fischer GB, César JA, Lempek BS, Barbosa LV Jr, Zogbi L, et al. Acute lower respiratory illness in under-five children in Rio Grande, Rio Grande do Sul State, Brazil: prevalence and risk factors. *Cad Saude Publica.* 2008. 24 (6): 1429-38.
15. Bricks LF. Judicious use of medication in children. *J Pediatr (Rio J).* 2003; 79: S107-14.
16. Rodrigues JC, da Silva Filho, LVF, Bush A. Etiological diagnosis of pneumonia – a critical view. *J Pediatr (Rio J).* 2002; 78 (S2): S129-140.
17. Brittain-Long R, Nord S, Olofsson S, Westin J, Anderson LM, Lindh M. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. *J Clin Virol.* 2008; 41 (1): 53-6.
18. McIntosh K. Community acquired pneumonia in children. *N Engl J Med.* 2002; 346 (6): 429-37.

19. Baer G, Engelke G, Abele-Horn M, Schaad UB, Heininger U. Role of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* as causative agents of community-acquired pneumonia in hospitalised children and adolescents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003; 22 (12): 742-5.
20. Weber MW, Gopalakrishna G, Awomoyi A, Cunningham A, Adegbola RA, Falade AG, et al. The role of *Chlamydia pneumoniae* in acute respiratory tract infections in young children in The Gambia, West Africa. *Ann Trop Paediatr*. 2006; 26 (2): 87-94.
21. Stralioatto SM, Nestor SM, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96 (2): 155-8.
22. Stralioatto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha ML, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35 (4): 283-91.
23. Stralioatto SM, Siqueira MM, Machado V, Maia TM. Respiratory viruses in the pediatric intensive care unit: prevalence and clinical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99 (8): 883-7.
24. D'Elia C, Siqueira MM, Portes SA, Sant'Anna CC. Respiratory syncytial virus -- associated lower respiratory tract infections in hospitalized infants. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38 (1): 7-10.
25. Costa LF, Yokosawa J, Mantese OC, Oliveira TF, Silveira HL, Nepomuceno LL, et al. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlandia, MG, Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*. 2006; 101 (3): 301-6.

26. Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DBL, Golono MA, et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in Southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2007; 83 (5): 422-8.
27. Rozov T. Contribuição ao estudo da etiologia das pneumopatias da infância, por meio da aspiração pulmonar transcutânea [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1973.
28. Ferreira OS. Agentes Bacterianos Causais das Pneumonias da Criança no Recife [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 1976.
29. Cuevas LE, Nassr AMB, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2003; 9 (12): 1626-8.
30. Serafino RL, Gurgel RQ, Dove W, Hart CA, Cuevas LE. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus in children over two seasons with a high incidence of respiratory infections in Brazil. *Ann Trop Paed*. 2004; 24: 213-7.
31. Brand PL, Baraldi E, Bisgaard H, Boner AL, Castro-Rodriguez JA, Custovic A, et al. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. *Eur Respir J*. 2008; 32 (4): 1096-1110.
32. Pending submission: Hopkins M, Correia J, Hart I. Validation of a Six-Target Real-Time PCR Assay to Assist in the Diagnosis of Viral Respiratory Illness. Liverpool, UK, 2010.
33. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230 (4732): 1350-4.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (DUAS VIAS)
(CRIANÇAS ATENDIDAS NA EMERGÊNCIA)

Pesquisa: Prevalência, patogênese e fatores de risco para gravidade das infecções agudas virais do trato respiratório em lactentes e pré-escolares em Recife, Brasil.

Caro Sr(a) _____ (nome do pai, mãe ou responsável).

Meu nome é _____ e sou pesquisador(a) do IMIP. Em conjunto com a Universidade de Liverpool (Inglaterra), estamos fazendo uma pesquisa sobre problemas respiratórios nas lactentes e pré-escolares. Esta pesquisa pretende estudar vírus e algumas bactérias que causam problemas respiratórios, como resfriado, pneumonia e bronquiolite (inflamação dos brônquios), além de conhecer melhor os fatores que levam estas infecções a serem mais graves em algumas crianças. Esses fatores incluem a produção de algumas substâncias de defesa, assim como de características herdadas (ou genéticas) das crianças.

Sua participação e de sua criança forneceriam informações importantes aos médicos sobre os vírus mais comuns e os mecanismos com que estes causam infecções respiratórias em crianças.

Por isso, peço sua autorização para que sua criança participe da pesquisa. Solicitamos que respondam um questionário, com perguntas sobre sua família e a sua criança.

Após o questionário, nós gostaríamos de retirar uma amostra do catarro do nariz da sua criança, utilizando um tubinho plástico estéril (limpo). Isto não será perigoso nem doloroso, mas sua criança pode não gostar. Gostaríamos também de retirar uma amostra de sangue (3ml) de sua criança para testes de laboratório. Isto também não será perigoso, e evitaremos que seja doloroso utilizando uma pomada anestésica. Caso sua criança piore pedimos sua autorização para repetir o exame do catarro do nariz e de sangue de sua criança. Se sua criança necessitar realizar outros exames durante o atendimento/internamento, aproveitaremos a mesma coleta de sangue.

O tratamento de sua criança seguirá a rotina do Hospital. Embora não possamos oferecer os resultados do estudo imediatamente, podemos enviá-lo, para sua casa assim que tivermos o resultado, se você desejar. Você deve se sentir completamente livre para participar do estudo. Se você participar ou não deste estudo não fará nenhuma diferença no tratamento de sua criança, e você tem todo o direito de pedir para ser excluída do estudo a qualquer momento em que você julgar necessário. Isso não causará nenhuma restrição no tratamento de sua criança. Nem os testes nem qualquer outro exame ou procedimento lhe custarão dinheiro.

Solicitamos a autorização para consulta a informações complementares nos prontuários e garantimos que nenhuma informação que possa identificar sua criança ou sua família será revelada.

Se o (a) Sr. (a) tiver qualquer dúvida com respeito à pesquisa, poderá entrar em contato comigo pelo telefone _____ ou com Drs. Jailson Correia e Murilo Britto, pesquisadores responsáveis, pelo telefone (81) 2122-4702.

Recife, ____ de _____ de 20 ____.

Pai, mãe ou responsável pelo menor

Pesquisador (a) responsável pelo estudo

APÊNDICE 2 - INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Registro: Data da entrevista: // Hora: :

Data do atendimento na emergência: // Hora: :

Entrevistador: _____

DADOS GERAIS:

Participante: _____

Endereço: _____

Ponto de referência: _____

Responsável: _____

Telefones: -

-

Data de nascimento //

Sexo (Masculino=1, Feminino=2)

HISTÓRIA MÉDICA PREGRESSA

1 - Peso ao nascimento <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 9999 Não sabe	PNAS <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
2 - A criança foi prematura (nasceu antes dos 9 meses)? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, idade gestacional semanas <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> semanas 99 Não sabe	PREMAT <input type="checkbox"/> IGSEM <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
3 - A criança já teve alguma vez na vida? Pneumonia [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, primeiro episódio: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> meses Quantas vezes: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Tosse durante mais de 1 mês [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, quantas vezes: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Tuberculose [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, quando ocorreu: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> meses Cansaço/chiado/sibilância [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, primeiro episódio: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> meses Quantas vezes: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Asma referida por médico [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, primeiro episódio: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> meses Rinite alérgica referida por médico [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, primeiro episódio: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> meses Urticária [1] Sim [2] Não [9] Não sabe	PNEUMONIA <input type="checkbox"/> 1VEZPNEUMO <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> VEZESPNEUMO <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> TOSSE1MES <input type="checkbox"/> VEZESTOSSE <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> 1VEZTB <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> SIBILO <input type="checkbox"/> 1VEZSIBILO <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> VEZESSIBILO <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> ASMA <input type="checkbox"/> 1VEZASMA <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> RINITE <input type="checkbox"/> 1VEZRINITE <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> URTIC <input type="checkbox"/>

<p>Conjuntivite alérgica [1] Sim [2] Não [9] Não sabe</p> <p>Alergia a picada de inseto [1] Sim [2] Não [9] Não sabe</p> <p>Alergia alimentar [1] Sim [2] Não [9] Não sabe</p> <p>Alergia a medicamento [1] Sim [2] Não [9] Não sabe</p>	<p>CONJUNT <input type="checkbox"/></p> <p>INSETO <input type="checkbox"/></p> <p>ALIM <input type="checkbox"/></p> <p>MEDIC <input type="checkbox"/></p>
<p>4 - A criança já foi internada alguma vez por:</p> <p>Asma [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, quantas vezes <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>Diarréia [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, quantas vezes <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>Desnutrição [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, quantas vezes <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>Pneumonia [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, quantas vezes <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>A criança ficou internada nos últimos 30 dias? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, qual a causa? _____</p>	<p>INTASMA <input type="checkbox"/> NINTASMA <input type="checkbox"/></p> <p>INTDIARR <input type="checkbox"/> NINTDIARR <input type="checkbox"/></p> <p>INTDESNU <input type="checkbox"/> NINTDESNU <input type="checkbox"/></p> <p>INTPNEUMO <input type="checkbox"/> NINTPNEUMO <input type="checkbox"/></p> <p>INTOUTRAS <input type="checkbox"/> OUTINT _____</p>
<p>5 - A criança tem ou já teve:</p> <p>Doença do coração? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, qual _____</p> <p>Doença do pulmão? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, qual _____</p> <p>Deficiência de imunidade? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, qual _____</p> <p>A criança tem ou já teve alguma outra doença? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, qual _____</p>	<p>DCORA <input type="checkbox"/> TIPOCOR _____</p> <p>DPULM <input type="checkbox"/> TIPODP _____</p> <p>DIMUNO <input type="checkbox"/> TIPODI _____</p> <p>DOUTRA <input type="checkbox"/> TIPODO _____</p>
<p>6 – Imunizações:</p> <p>BCG Doses <input type="checkbox"/> [0] Nenhuma [9] Desconhecido/ sem cartão/ ilegível</p> <p>Hepatite B (HB) Doses <input type="checkbox"/> [0] Nenhuma [9] Desconhecido/ sem cartão/ ilegível</p> <p>Sabin (Pólio) Doses <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> [0] Nenhuma [99] Desconhecido/ sem cartão/ ilegível</p> <p>Tetra (DPT+HIB) Doses <input type="checkbox"/> [0] Nenhuma [9] Desconhecido/ sem cartão/ ilegível</p>	<p>BCG <input type="checkbox"/></p> <p>HB <input type="checkbox"/></p> <p>SABIN <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>TETRA <input type="checkbox"/></p>

<p>DPT (Tríplice) Doses <input type="checkbox"/>[0] Nenhuma [9] Desconhecido/ sem cartão/ ilegível</p> <p>HIB Doses <input type="checkbox"/>[0] Nenhuma [9] Desconhecido/ sem cartão/ ilegível</p> <p>Tríplice viral (MMR) Doses <input type="checkbox"/>[0] Nenhuma [9] Desconhecido/ sem cartão/ ilegível</p> <p>Rotavírus Doses <input type="checkbox"/>[0] Nenhuma [9] Desconhecido/ sem cartão/ ilegível</p> <p>Pneumo 7 valente Doses <input type="checkbox"/>[0] Nenhuma [9] Desconhecido/ sem cartão/ ilegível</p> <p>Pneumo 23 Doses <input type="checkbox"/> [0] Nenhuma [9] Desconhecido/ sem cartão/ ilegível</p> <p>Gripe (Influenza) Doses <input type="checkbox"/> [0] Nenhuma [9] Desconhecido/ sem cartão/ ilegível</p> <p>Há quanto tempo fez a dose mais recente <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> meses</p>	<p>DPT <input type="checkbox"/></p> <p>HIB <input type="checkbox"/></p> <p>MMR <input type="checkbox"/></p> <p>ROTA <input type="checkbox"/></p> <p>PNEUMO7 <input type="checkbox"/></p> <p>PNEUMO23 <input type="checkbox"/></p> <p>GRIFE <input type="checkbox"/></p> <p>TEMPOGRIFE <input type="checkbox"/></p>
<p>7 – A criança mama? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe</p> <p>Se sim, pule as próximas duas questões</p> <p>8 – A criança mamou? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe</p> <p>9 – Se sim, até que idade mamou? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> meses</p> <p>10 - Enquanto mama(va), recebe(u) outro alimento (incluindo água)? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe</p> <p>Caso afirmativo, com que idade começou a receber outro alimento? <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> meses <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias</p>	<p>MAMA <input type="checkbox"/></p> <p>MAMOU <input type="checkbox"/></p> <p>MAMOUMESSES <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>OUTRALIM <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>OUTRALIMDIA <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>
<p>11 – Tipo de moradia: [1] Casa [2] Apartamento [3] Quarto/cômodo [4] Outro [9] Não sabe</p> <p>12 – Quantos cômodos ao todo? <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>13 – Servindo de dormitório <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>14 - De que são feitas as paredes da moradia? [1] Alvenaria ou tijolo [2] Taipa [3] Madeira [4] outro [9] Não sabe</p> <p>15 – O abastecimento de água chega até dentro de casa? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe</p> <p>16 – Tratamento da água de beber: [1] Fervida [2] Filtrada [3] Mineral [4] Outro [5] Sem tratamento [9] Não sabe</p> <p>17 – Tipo de luz utilizada: [1] Elétrica [2] Gás [3] Querosene [4] Outros [9] Não sabe</p> <p>18 – Número de pessoas que dormem na casa: <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> [99] Não sabe</p>	<p>TIPOCASA <input type="checkbox"/></p> <p>CMDTOTAL <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>COMODORME <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>PAREDE <input type="checkbox"/></p> <p>AGUA <input type="checkbox"/></p> <p>TRATAGUA <input type="checkbox"/></p> <p>LUZ <input type="checkbox"/></p> <p>DORMEM <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>

19 – Número de pessoas que dormem no mesmo quarto com a criança (incluindo a criança): <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> [99] Não sabe	DORMCRIAN <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
20 – A mãe da criança mora em casa? [1] Mãe biológica [2] Madrasta [3] Não mora em casa [4] Falecida [9] Outra condição	PRESMAE <input type="checkbox"/>
21 – Qual a idade materna? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> [99] Não sabe/ não é pertinente	IDADEMAE <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
22 – Ocupação materna: _____	OCUPMAE _____
23 – Quantos anos completos a mãe estudou? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> [99] Não sabe	ESCOLMAE <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
24 – O pai da criança mora em casa? [1] Pai biológico [2] Padrasto [3] Não mora em casa [4] Falecido [9] Outra condição	PRESPAI <input type="checkbox"/>
25 – Qual a idade paterna? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> [99] Não sabe/ não é pertinente	IDADEPAI <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
26 – Ocupação paterna: _____ [9] Não sabe	OCUPAI <input type="checkbox"/>
27 – Quantos anos completos o pai estudou? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> [99] Não sabe	ESCOLPAI <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
28 – Número de irmãos mais novos: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> [99] Não sabe	IRMAOSN <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
29 – Número de irmãos mais velhos: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> [99] Não sabe	IRMAOSV <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
30 - Número de crianças menores de 18 anos (incluindo a criança): <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> [99] Não sabe	MENORES <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
31 - Quanto o chefe da família ganhou com o seu trabalho no mês passado? (a pessoa que possuir a maior renda em casa): Salário: R\$ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> ,00 [9999] Não sabe	RENDCHEF <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
32 - O chefe da família teve outro trabalho ou rendimento no mês passado? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe	TRABOUTRO <input type="checkbox"/>
33 – Quanto ganhou? R\$ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> ,00 [9999] Não sabe	OUTCHEF <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
34 – No mês passado, quanto ganharam as outras pessoas que moram na casa? R\$ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> ,00 [9999] Não sabe	OUTPESSO <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
35 – A família está inscrita no PROGRAMA BOLSA FAMÍLIA (PBF)? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe	PBF <input type="checkbox"/>
36 - Quanto ganhou do PBF no mês passado? R\$ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> ,00 [9999] Não sabe	GANHOPBF <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
37 – Há pessoas que fumam na casa? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe	FUMAM <input type="checkbox"/>

<p>38 - O que é usado para cozinhar na casa? [1] Gás [2] Madeira ou carvão [3] Eletricidade [4] Outros [5] Gás e madeira ou carvão [6] Gás e eletricidade [7] Madeira ou carvão e eletricidade [8] Outras combinações [9] Não sabe</p>	<p>COZINHA <input type="checkbox"/></p>
--	---

HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL – DURAÇÃO DA DOENÇA

<p>39 – Coriza [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, início <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas Duração <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas</p>	<p>CORIZA <input type="checkbox"/> INICIOCORIZ<input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> DURACORIZ <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>
<p>40 – Tosse [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, início <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas Duração <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas</p>	<p>TOSSE <input type="checkbox"/> INICIOTOSSE<input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> DURATOSSE <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>
<p>41 – Dificuldade para respirar ou cansaço [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, início <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas Duração <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas</p>	<p>DIFICRESP <input type="checkbox"/> INICIODRESP<input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> DURADRESP <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>
<p>42 – Chiado no peito/sibilância [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, início <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas Duração <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas</p>	<p>CHIADO <input type="checkbox"/> INICIOCHIA<input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> DURACHIADO <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>
<p>43 – Apnéia [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, início <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas Há quanto tempo? <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas</p>	<p>APNEIA <input type="checkbox"/> INICIOAPN<input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> TAPNEIA <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>
<p>44 – Cianose [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, início <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas Duração <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas</p>	<p>CIANOSE <input type="checkbox"/> INICIOCIAN<input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> DURACIAN <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>
<p>45 – Gemido [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, início <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas Duração <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas</p>	<p>GEMIDO <input type="checkbox"/> INICIOGEM<input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> DURAGEM <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>
<p>46 – Febre [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, início <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas Duração <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas</p>	<p>FEBRE <input type="checkbox"/> INICIOFEBR<input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> DURAFEBRE <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>
<p>47 – Otagia [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Se sim, início <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas Duração <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas</p>	<p>OTALGIA<input type="checkbox"/> INICIOOT<input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> DURAOOT <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>
<p>48 – Outros _____ Início <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas Duração <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas</p>	<p>OUTR1 _____ INICIOOUTR1<input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> DURAOUTR1 <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>
<p>49- Outros _____ Início <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas Duração <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> horas</p>	<p>OUTR2 _____ INICIOOUTR2<input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> DURAOUTR2 <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p>

Exame Físico na Emergência:	
50 – Peso <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> gramas	PESO <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
51 – Altura <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> cm	ALTURA <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
52 - Temperatura axilar <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> , <input type="checkbox"/> °C	TAXILAR <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
53 – Frequência cardíaca <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> bpm	FC <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
54 – Frequência respiratória <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> /min	FR <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
55 – Tiragem [1] Sim [2] Não	TIRAGEM <input type="checkbox"/>
56 – Cianose [1] Sim [2] Não	CIANOSE <input type="checkbox"/>
57 – Saturometria de O2 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> % Se em uso de O2, qual a concentração de O2 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> %	SATO2 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> FiO2ADM <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
58 – Sinais de OMA na otoscopia [1] Sim [2] Não [3] Não realizada	OTOSC <input type="checkbox"/>

Diagnósticos clínicos na emergência:	
59 – Rinofaringite [1] Sim [2] Não	DIVAS <input type="checkbox"/>
60 – IVA com Sibilância/ asma: [1] Sim [2] Não	DASMA <input type="checkbox"/>
61 – Amigdalite/Faringite: [1] Sim [2] Não	DAMIGD <input type="checkbox"/>
62 – Laringotraqueobronquite/laringite/Laringotraqueíte: [1] Sim [2] Não	DLARING <input type="checkbox"/>
63 – Bronquiolite: [1] Sim [2] Não	DBRONQUIOL <input type="checkbox"/>
64 – Pneumonia ou BCP: [1] Sim [2] Não	DBCP <input type="checkbox"/>
65 – Pneumonia ou BCP com derrame: [1] Sim [2] Não	DBCPDERR <input type="checkbox"/>
66 – Otite média aguda: [1] Sim [2] Não	DOMA <input type="checkbox"/>
67 – Outros (especificar): _____	DOUTR3

68 – Fez Rx de tórax na emergência? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe Laudo do Rx de tórax emergência: _____ _____	RX EMERG <input type="checkbox"/> Laudo RXEMERG _____
---	---

69 – No momento da admissão, a criança está aceitando bem a alimentação? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe	ALIMENTAÇÃO <input type="checkbox"/> INICIOBXALIM <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> DURABXALIM <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
70 – No momento da admissão, a criança tem dificuldade para mamar? [1] Sim [2] Não [9] Não sabe/não mama Se sim, início <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> horas	DIFICMAMAR <input type="checkbox"/> INICDIFMAMAR <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

<p>86 – Na 1ª gasimetria após a admissão no IMIP</p> <p>FiO2 <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/> %</p> <p>PaO2 <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/> %</p> <p>PaCO2 <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/> mmHg</p> <p>pH <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>87 - Antibioticoterapia nos primeiros 3 dias de admissão [1] Sim [2] Não</p> <p>Qual antibiótico? [1] Ampí [2] Ampí + gentamicina [3] Oxacilina + cloranfenicol</p> <p>[4] Outros. Especificar _____</p> <p>88 - Presença de infecção hospitalar [1] Sim [2] Não</p> <p>89 – Duração da resolução dos sintomas e sinais? <input type="text"/><input type="text"/> dias</p> <p>90 - Tempo de permanência hospitalar em dias <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>91 - Data da alta: <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>Hora da alta: <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>92 - Estado da saída [1] Alta [2] Óbito [3] Transferência</p> <p>93 – Hemocultura: [1] Sim [2] Não</p> <p>94 - Diagnóstico(s) na alta _____</p>	<p>FIO₂ <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>PaO₂ <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>PaCO₂ <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>pH <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>ATBPADM <input type="checkbox"/></p> <p>QUALATB <input type="checkbox"/></p> <p>IH <input type="checkbox"/></p> <p>DURSINT <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>TPPERMHOSP <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>Dalta <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>Halta <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>Estado da saída <input type="checkbox"/></p> <p>SGCULT <input type="checkbox"/></p> <hr/>
---	--

APÊNDICE 3 – PROCEDIMENTOS PARA COLETA E PROCESSAMENTO LABORATORIAL DO ASPIRADO NASOFARÍNGEO

1- Coletar a secreção nasofaríngea usando sonda de aspiração traqueal estéril número 6 acoplada à bomba de aspiração manual. Ainda na emergência, diluir o aspirado em 3 tubos com 1ml de solução salina tamponada cada e refrigerá-los até o processamento laboratorial em duas horas.

2- Filtrar o ANF com SF para o tubo cônico graduado através do tecido de 60 microns com pipeta de 1ml. Anotar o volume pós filtrado.

3- Pipetar 10 microlitros da amostra e misturar em tubo de Eppendorf de 1ml com 10 microlitros de (azul de tripano) – 1:1.

4- Calcular o percentual de viabilidade e concentração de células /ml (hemacitômetro). As células viáveis são as que não ficam coradas pelo azul de tripano.

5- Usando o volume pós-filtração, calcular e anotar o número de células totais na amostra.

-Processamento com Trizol (seguir passos de 6 a 11):

6- Dividido o número de células totais por 2.000.000 para fornecer o volume de Trizol necessário para solubilizar as células após a centrifugação.

7- Centrifugar a amostra a 500g (3800rpm) por 5 minutos a 4°C.

8- Aliquotar o sobrenadante (de 500mcl – 0,5ml) e estocar em criotubo em freezer a -70°C.

9- Adicionar Trizol ao concentrado de células para dar uma concentração de 2.000.000 de células por ml, como foi calculado pela contagem de células.

10- Homogeneizar o concentrado de células.

11- Aliquotar a mistura da amostra com o Trizol (de 500 em 500µl – 0,5ml) e estocar em freezer a -70°C.

-Processamento com RLT lysis buffer (passos de 12 a 16):

12- Centrifugar a amostra a 500g (3800rpm) por 5 minutos a 4°C.

13- Aliquotar o sobrenadante (500µl) e estocar em criotubos a -70°C.

14- Adicionar 10µL de 2-mercaptoetanol a 1mL de RLT lysis buffer. Preparar a solução no mesmo dia (válido por 1 semana em temperatura ambiente).

15- Um volume de 350µL dessa solução é necessária para lisar 5×10^6 células. Esse volume é adicionado ao agrupamento de células (cell pellet). Um volume de 350µL é usado para lisar 500 células. Acima desse número, um volume proporcional é calculado.

16- Pipetar algumas vezes para assegurar a completa lise – a solução deve estar clara antes de ser colocada no freezer a -70°C, em alíquotas de 500µl.

APÊNDICE 4 - PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA A EXTRAÇÃO DO RNA/DNA

Preparação das amostras para a extração do RNA e DNA no QIA Symphony

1- Descongelar amostras do freezer a -70°C .

2- Colar etiquetas com códigos de barra (luvas calçadas):

- 1 para o livro de registro laboratorial.

- 1 para o tubo de amostra + buffer.

- 1 para o tubo do eluato.

3- Estação de trabalho – capela de fluxo laminar (luvas calçadas):

- Limpar superfície com álcool isopropílico.

- Colocar dentro da capela: o Vortex, duas caixas de ponteiros livres de DNA/RNA de 100 e 300 μL , lixo para ponteiros, frasco de ATL buffer, racks com as amostras (etiquetas vermelhas) e tubos vazios para as amostras + buffer, e frasco com água destilada.

- Tubos para colocar o ATL buffer e amostras para a extração:

- Pipetar 100 μL do buffer nos frascos vazios e no frasco do controle negativo.

- Colocar um tubo de amostra por vez no Vortex durante 5 a 10 segundos.

- Pipetar 300 μL da amostra para a extração. Não permitir a formação de bolhas.

- Volume total por tubo = 400 μL (300 μL da amostra + 100 μL do buffer). Obs.: caso a amostra contenha menos de 300 μL , completar para 300 μL com buffer ATL. Calibrar a pipeta com volume definido (ex. 200 ou 250 μL).

- Adicionar 300 µL de água destilada no frasco de controle negativo.
- Ao final, limpe a superfície da capela com álcool isopropílico.

Estação de trabalho - QIASymphony (luvas calçadas):

1- Ligar o QIASymphony.

- Obs.: existem quatro gavetas: AMOSTRAS, REAGENTES E CONSUMÍVEIS, RESÍDUOS E ELUATO. A preparação da máquina inicia-se com a gaveta do eluato, seguida dos resíduos e finaliza com a gaveta das amostras.

2- Abrir a gaveta do eluato:

- Escanear o código de barra que se deseja usar (ex. n.1).
- Pressionar “yes” e selecione o adaptador de eluição que se deseja utilizar – “Coolable Sarsted 24 tube rack”.
- Colocar o adaptador da abertura:
 - Colocar os tubos etiquetados para o eluato no adaptador de eluição.
 - Locais do rack para eluição:
 - Cada rack possui 24 locais:
 - A1:1 a 24;
 - A2: 1 a 24, sendo o controle negativo colocado na posição 12 e o controle positivo na posição 13 (FLU AB).
- Pressionar “add”.
- Repetir etapas para o local 2 – “Adapter 24 tube screw cap”.
- Fechar a gaveta.
- Pressionar “close”.
- Aguardar pelo escaneamento do inventário para a gaveta da eluição.

3 – Abrir a gaveta dos resíduos:

- Reabastecer os cartuchos vazios e colocar um novo saco de lixo.
- Assegurar-se que existam quatro caixas vazias.
- Assegurar-se que o frasco para resíduos líquidos está vazio.
- Fechar a gaveta de resíduos e iniciar e aguardar o término do escaneamento do inventário.

4- Abrir a gaveta dos reagentes e consumíveis:

- Assegurar que existam:
 - 3 caixas cheias de “Sample Prep Cartridges”.
 - 1 caixa cheia de “Rod Covers”.
 - 4 racks cheios de ponteiros azuis de 200 μ L.
 - 14 racks cheios de ponteiros pretas de 1500 μ L.
- Preencher os cartuchos de reagentes necessários para a extração.
 - Colocar as esferas magnéticas no Vortex por três minutos antes de carregá-las no cartucho de reagentes. Certificar-se que o papel de alumínio foi removido.
 - Limpar os códigos de barra com lenço de papel antes de carregá-las no cartucho.
 - Certificar-se que o rack de enzimas foi adicionado.
 - Certificar-se que todas as tampas dos tubos de reagentes foram removidas.
- Pressionar “scan bottle” na tela do “reagents and consumables” e escanear o código de barras do Buffer ATL. Colocar o ATL buffer no deck.
 - Certificar-se que nenhum material precipitado esteja visível no ATL buffer. Se for o caso, aquecer a 37 °C até a sua dissolução (forno de microondas por 5 segundos).

- Fechar lentamente a gaveta dos reagentes e consumíveis e iniciar o escaneamento do inventário.

5 – Abrir a gaveta das amostras:

- Colocar o suporte de tubos na linha de parada da abertura escolhida (ex. 1) e aguardar até a luz verde piscar.

- Deslizar o suporte de tubos lenta e suavemente.

- Aguardar pela luz laranja.

- Pressionar o botão lote que agora sinaliza “carregado” e tornou-se azul.

- Atribuir o protocolo “Labware”: “pathogen – RNA”.

- Editar as identificações dos tubos, se necessário.

- Atribuir um ensaio de controle.

- Pressionar “next”.

- Atribuir um slot para o eluato

- Definir o volume do eluato (ex. 60).

- Pressionar “queue”.

- Repetir se lotes maiores forem ser processados.

- Carregando os controles internos de RNA transportador:

- Colocar o tubo na linha de parada da abertura escolhida (ex. A) e aguardar até a luz verde piscar.

- Deslizar o suporte de tubos lenta e suavemente.

- Aguardar pela luz laranja.

- Pressionar o botão “IC” que agora sinaliza “carregado” e tornou-se azul.

- Atribuir o “Labware”.

- Atribuir o controle interno necessário.

- Pressionar “OK”.

- Pressionar “RUN”.

6- Amostras, controle interno, controles positivos e controles negativos:

- 1 X controle interno (Carrier RNA – 480 µL + MS2 – 166 µL + AVE – 20 ml)

para cada 8 amostras. Colocar o controle o controle interno no rack A.

- Incluir em cada rodada:

- 1 X controle positivo (FLU AB - 300 µL + Buffer ATL - 100 µL).

- 1 X controle negativo (distilled water - 300 µL + Buffer ATL - 100 µL).

- Colocar as amostras nos racks.

- Na tela “touch screen”:

- Digitar o tipo de tubo da amostra (2ml).

- Digitar as identificações das amostras.

- Uma vez finalizado, pressionar “escaneamento total”.

- Ordenar 3 X o mesmo código de barra: 1. Tubo da amostra; 2. Tubo do eluato;

3. Arquivo.

7- Removendo um lote processado:

- Abrir a gaveta do eluato.

- Retirar o rack da abertura.

- Trocar as tampas dos tubos com o RNA extraído por novas tampas numeradas

com adesivos verdes e estocar os tubos em freezer a - 70 °C.

8- Manutenção:

- No menu principal, pressionar “maintenance”.

- Pressionar luz “UV light” por 15 minutos.

9- Desligar o QIA Symphony.

APÊNDICE 5 – PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA O MULTIPLEX PCR

- Laboratório de “specially difficult organisms”:

- Levar amostras de RNA/DNA extraído em ordem no rack.
- Encher bandeja com gelo.
- Programar 2 minutos no timer.
- Colocar criotubos no suporte aquecido para desnaturar o RNA/DNA.
- Ao final de 2 minutos, retirar criotubos do suporte e colocá-los na bandeja com gelo.
- Transferir criotubos em ordem para rack.
- Preparar o protocolo FLU 4 plex MM.
- Reagentes ficam no freezer a -20°C .
- Invit 1-step qRTPCR (frasco azul) – vortex por 5 segundos – centrifugar por 5 segundos – $650\ \mu\text{L}$.
- Clear primer – agitar suavemente – centrifugar por 5 segundos – $52\ \mu\text{L}$.
- Flu pdC Probe mix – agitar suavemente – centrifugar por 5 segundos – $13\ \mu\text{L}$.
- Superscript Enz (frasco preto – último a ser retirado da geladeira) – agitar suavemente – centrifugar por 5 segundos) – $26\ \mu\text{L}$.
- H₂O – $299\ \mu\text{L}$.
- Misturar reagentes na cabine de segurança, usando luvas e criotubos e ponteiros DNA e RNA free.
- Ao final, ligar luz ultravioleta e guardar reagentes na geladeira.

- Laboratório de trabalho:

- Manipular placa de PCR pelas bordas com luvas, marcá-la com letras A, B, C e D e n. 3, 6 e 9 para facilitar pipetagem e mantê-la sobre o gelo (para evitar início das reações).
- Pipetar 20 µL do FLU 4 plex MM.
- Pipetar 5 µL do RNA extraído, indo com a pipeta até o fundo do orifício e subindo com a ponteira pelas laterais do orifício.
- Ao término, aplicar papel adesivo com cuidado para não encostar os dedos.
- Manter a placa sobre o gelo.

- Laboratório de PCR:

- Centrifugar a placa por tempo pré-determinado: 150g/1min.
- Abrir máquina de PCR LightCycler 480 Real-Time PCR System and Software (Roche) e colocar a placa.
- Aguardar por 2 luzes verdes.
- No monitor: <novo exame>, protocolo <upper resp 6 phx runprotocol>.
- Salvar em novo arquivo: <Recife FLU dia-mês-ano>
- Editar quantidade de orifícios.

Protocolo – FLUAV + FLUBV + HRSV + HMPV

		Flu 4plex MM			
95oC	2 min**		<u>1x</u>	<u>26</u>	<u>52</u>
		Invit 1-step qRT-PCR	12.5	326	650
50oC	20 min	hMPV/RSV/Flu F+R	1	26	52
95	2 min	Flu pdC Probe mix	0.25	6.5	13
95	10 sec	Superscript Enz	0.5	13	26
58	45 sec	H2O	5.75	149.5	299
72	1 sec	RNA	5		

x 50

**

20 µL + 5 µL of extracted RNA

Protocolo - HCoV OC43 + NL63 + 229E + HKU1

		IH hCoV Multiplex MM		
95oC	2 min**		<u>1x</u>	100
		Invit 1-step qRTPCR	12.5	1250
50oC	20 min	hCoV primer mix	1	100
95	2 min	hCoV probe mix	0.4	40
95	10 sec	Superscript Enz	0.5	50
58	45 sec	H2O	5.6	560
72	1 sec	RNA	5	

x 50

**

20 µL + 5 µL of extracted RNA

Protocolo - PIV1 + PIV 2 + PIV 3 + PIV 4 + HRV + CONTROLE INTERNO

		IH PIV Multiplex MM		
95oC	2 min**		<u>1x</u>	100
		Invit 1-step qRTPCR	12.5	1250
50oC	20 min	PIV, MS2 primer mix	1	100
95	2 min	Guns Rhino F+R (10uM)	1	100
95	10 sec	PIV, MS2 probe mix	0.4	40
58	45 sec	Guns Rhino Hex (10 uM)	0.4	40
72	1 sec	Superscript Enz	0.5	50
		H2O	4.2	420
		RNA	5	

x 50

**

20 µL + 5 µL of extracted RNA

APÊNDICE 6 – DIVULGAÇÃO DA PESQUISA

6.1. Artigo 1 - Resumo publicado no American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine

B55 PEDIATRIC RESPIRATORY INFECTION / Thematic Poster Session / Monday, May 17/8:15 AM-4:00 PM / Area G, Hall G (First Level), Morial Convention Center

Viral Causes Of Acute Respiratory Infection In Pre-school Children

K. Rose¹, P. Bezerra², C. Duarte², M. Britto², A. Fonseca³, M. Hopkins¹, J. Correia², C. A. Hart¹, P. McNamara¹

¹Alder Hey Children's NHS Foundation Trust, Liverpool, United Kingdom, ²IMIP Children's Hospital, Recife, Brazil, ³University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom

Corresponding author's email: k.rose@liv.ac.uk

Rationale: Acute respiratory infection (ARI) is a leading cause of morbidity and mortality in children worldwide. The aims of this study were to determine the viral causes of ARI in different conditions (bronchiolitis, pneumonia, acute episodic wheeze and upper respiratory tract infection (URTI)) and their impact on severity of disease, in children < 5 years of age in North-Eastern Brazil.

Methods: In a paediatric A&E department (IMIP Hospital, Recife), clinical data and nasopharyngeal aspirates (NPA) were prospectively collected from 457 children (<5 years) presenting with ARI (bronchiolitis [n=255]; pneumonia [n=120]; acute episodic wheeze [n=57]; URTI [n=25]), over a 14-month period. Disease severity was determined in a standardised way based on lower respiratory tract signs, need for hospital admission and need for oxygen. Multiplex PCR was used to detect 16 different respiratory pathogens including Influenza A&B, Parainfluenza 1-4, Respiratory Syncytial Virus (RSV), Rhinovirus, human Metapneumovirus (hMPV), Coronaviruses, Adenovirus, Mycoplasma and Chlamydia pneumoniae.

Results: One or more pathogens were identified in 403/467 (86%) NPAs. Co-infections were common (dual, 116/403 [29%]; triple, 31/403 [8%]). Overall the most prevalent pathogens were RSV (42% of samples), adenovirus (26%), rhinovirus (19%), hMPV (11%), and Mycoplasma pneumoniae (10%). In children with bronchiolitis, the predominant viral causes were RSV (49%), followed by adenovirus (28%) and rhinovirus (20%). In children with pneumonia, RSV (43%), followed by adenovirus (23%) and hMPV (15%) were the most common viral causes, whilst in children with acute episodic wheeze, RSV (32%) and adenovirus (32%), followed by rhinovirus (21%) predominated. Severe disease as determined by oxygen requirement was not associated with one particular pathogen or with co-infection.

Conclusion: In this population, viral pathogens were identified in a very high proportion of pre-school children with ARI, with co-infection being particularly common. Prevalence of some pathogens (for example adenovirus and Mycoplasma pneumoniae) in certain clinical conditions differed significantly from that described in the published literature. Disease severity did not appear to be linked with a particular virus or with co-infection.

This abstract is funded by: None

6.2. Artigo 1 - Resumo aceito no 3rd Congress of the European Academy of Paediatrics Societies

Abstract

3rd Congress of the European Academy of Paediatric Societies
Abstract: A-268-0010-01866

Topic: 21 Infectious disease (not nosocomial)

Title: MULTIPLE RESPIRATORY PATHOGENS IN CHILDREN YOUNGER THAN FIVE YEARS OLD WITH ACUTE LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION IN RECIFE, BRAZIL.

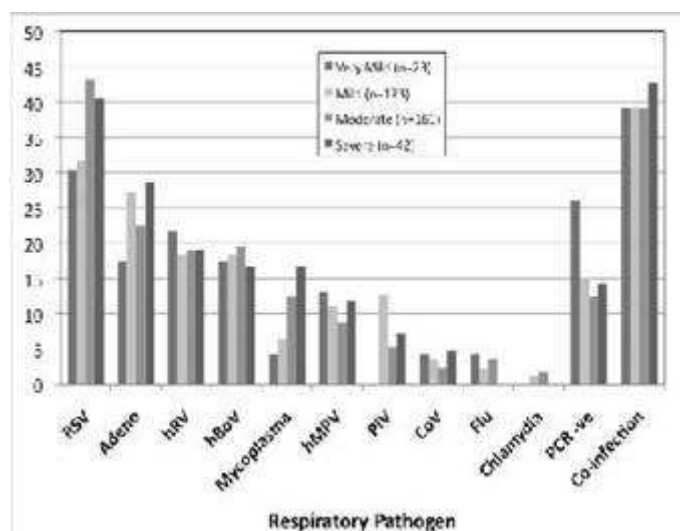
Author(s): P.G.D.M. Bezerra^{1,2}, M.C.A. Britto^{1,2}, J.D.B. Correia^{1,3}, M.C.M.B. Duarte¹, K. Rose⁴, M. Hopkins⁵, P. McNamara⁴

Institute(s): ¹Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, ²Faculdade Pernambucana de Saude, ³Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil, ⁴Institute of Child Health, ⁵Medical Microbiology, University of Liverpool, Liverpool, UK

Text: **Background and aims:** acute respiratory infections (ARI) have a worldwide disease burden with 4 million deaths annually. Very few studies have examined in detail the viral causes of specific clinical conditions in the under-5 age group. The aim of this study was to determine the prevalence of viral and atypical bacterial pathogens in children aged < 5 years presenting to an A&E department in Recife, Brazil with various clinical manifestations and severities of ARI.

Methods: a prospective cohort was conducted between April 2008 and March 2009. Clinical and demographic data on admission were transcribed from medical records. Nasopharyngeal aspirates (NPA) were collected and RNA was extracted from each sample. Five separate PCR assays detected 17 viral and atypical bacterial pathogens.

Results: Of the 407 NPA collected, 348 (85.5%) were positive for RSV (37.3%), adenovirus (24.8%), hRV (18.9%), bocavirus (18.7%), hMPV (10.3%) and *Mycoplasma pneumoniae* (9.8%). Co-infection was found in 161 samples (39.6%). Graph 1: relationship between respiratory pathogens and disease severity.



[Respiratory pathogens and disease severity]

RSV was more commonly associated with bronchiolitis and pneumonia, bocavirus with episodic viral wheeze (EVW)/asthma, and *Mycoplasma* with EVW/asthma and pneumonia.

Conclusions: RSV was the most common pathogen; there were higher rates of positivity (adenovirus/hbv/mycoplasma) and coinfection. We found no relationship between either pathogen/co-infection and disease severity.

6.3. Artigo 1 – Submetido ao Lancet Infectious Diseases

Elsevier Editorial System(tm) for The Lancet Infectious Diseases
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Viral and Atypical Bacterial Causes of Acute Respiratory Infection in Children Under Five Years

Article Type: Articles (Original Research)

Keywords: Acute Respiratory Infection
Mycoplasma Pneumoniae
Respiratory Syncytial Virus
Bronchiolitis
Pneumonia

Corresponding Author: Dr Paul Stephen McNamara, MBBS MRCPCH PhD

Corresponding Author's Institution: Institute of Child Health

First Author: Patricia G Bezerra, MD MSc

Order of Authors: Patricia G Bezerra, MD MSc; Murilo C Britto, MD MSc; Jailson B Correia, MD MTropPaed PHD; Maria M Duarte, MD MSc; Angela M Fonceca, BSc PhD; Katie Rose; Mark J Hopkins; Luis E Cuevas, MD MTropMed; Paul Stephen McNamara, MBBS MRCPCH PhD

Manuscript Region of Origin: UNITED KINGDOM

6.4. Artigo 2 – Submetido ao BMJ – British Medical Journal



Home [Author Area](#) [Reviewer Area](#) [Personal Info](#) [BMJ Home](#) [Sign Out](#) 0
[Submit New Manuscript](#) [Instructions for Authors](#) [Queue Summary](#) [Feedback](#) [Help](#) [FAQ](#)

Manuscripts Under Review (check status)

The manuscript below has entered the review process. Click on the links below the manuscript metadata to perform actions.

BMJ/2010/797654

Risk factors for hospitalization in children with viral respiratory infections in Recife, Brazil.

Patricia GM Bezerra, Murilo CA Brito, Maria do Carmo ME Duarte, Luis E Cuevas, Katie Rose, Angela Fonseca, Mark Hopkins, Charles A Hart, Paul S McNamara, and Jailson B Correia

Status: With Editorial Staff

Date Received: 25 Jun 2010

Article Types: Research

Corresponding Author: Patricia GM Bezerra

Keywords: None

Supplemental Files: 0

[\[Withdraw Paper\]](#) [\[PDF version of your paper\]](#) [\[HTML References\]](#) [\[Upload Patient consent form\]](#) [\[Download Patient consent form\]](#) [\[Additional/Supplemental Files\]](#)

PATRICIA BEZERRA, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Hguiera, Rua Acuarus, 76 ap. 1402, Rua dos Coelhos, 300
Recife, 52011-020 Brazil
Teli: (55-81) 3221-0335; Fax: (55-81) 2122-4722, Email: pmvbezerra@uol.com.br

BMJ

BMA House, Tavistock Square, London, WC1H 9JR UK

Te: +44 (0)20 7583 6309; Fax: +44 (0)20 7383 6418; Email: papersadmin@bmj.com

Copyright © 2010 by BMJ Publishing Group Limited

ANEXOS

ANEXO 1 - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Instituto de Medicina Integral
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Civil Filantrópica



DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa n° 896 intitulado **“Prevalência, patogênese e fatores de risco para gravidade das infecções agudas virais do trato respiratório em crianças menores de cinco anos em Recife, Brasil”** apresentado pelo pesquisador **Jailson de Barros Correia** foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP, em reunião de 09 de novembro de 2006.

Recife, 09 de fevereiro de 2010.



Dr. José Eulálio Cabral Filho
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL - Lei 9851 de 08/11/67
UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL - Lei 5013 de 14/05/64
UTILIDADE PÚBLICA FEDERAL - Dec. 86238 de 30/07/81
INSCRIÇÃO MUNICIPAL: 05.897-1
INSCRIÇÃO ESTADUAL - ISENTA
CNPJ: 10.988.301/0001-29

Rua dos Coelhos, 300 Boa Vista
Recife - PE - Brasil - CEP: 50.070-550
FAX: (81) 2122.4100
Fax: (81) 2122.4722 Cx. Postal 1393
e-mail: imip@imip.org.br
www.imip.org.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)