

Universidade Federal de Uberlândia

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Instituto de Ciências Biomédicas

**Co-infecção de rinovírus e alguns outros vírus respiratórios em crianças
apresentando doença do trato respiratório inferior, em Uberlândia, MG, Brasil**

Nayhanne Tizzo de Paula

Uberlândia

2010

Universidade Federal de Uberlândia
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
Instituto de Ciências Biomédicas

**Co-infecção de rinovírus e alguns outros vírus respiratórios em crianças
apresentando doença do trato respiratório inferior, em Uberlândia, MG, Brasil**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia
Aplicadas da Universidade Federal
de Uberlândia, como requisito
parcial para a obtenção do título de
mestre

Nayhanne Tizzo de Paula
Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz
(Orientadora)

Uberlândia

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P324c Paula, Nayhanne Tizzo de, 1984-

Co-infecção de rinovírus e alguns outros vírus respiratórios em crianças apresentando doença do trato respiratório inferior, em Uberlândia, MG, Brasil [manuscrito] / Nayhanne Tizzo de Paula. - 2010.

37 f. : il.

Orientadora: Divina Aparecida Oliveira Queiróz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Inclui bibliografia.

1. Doenças respiratórias infantis - Teses. I. Queiróz, Divina Aparecida Oliveira. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.2 - 053.2

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar o meu caminho;

Agradeço em especial à minha mãe Rosa, que sempre me encorajou e me deu apoio em todos os momentos de dificuldade;

À todos da minha família, que sempre me incentivaram;

À minha orientadora Prof. Dra. Divina A. O. Queiróz, pela oportunidade e ensinamentos que foram importantes para o meu crescimento;

Aos meus amigos de laboratório Guilherme Ramos, Thelma Mattos, Bruno Carneiro e Lourenço Costa por todo o auxílio, companheirismo e por todas as risadas que sempre fizeram parte da nossa rotina;

Ao Dr. Hélio Silveira pela preciosa ajuda nas fichas clínicas;

Aos laboratórios de Biologia Molecular, de Fisiologia do ICBIM e de genética do INGEB, pelos equipamentos cedidos e pelo espaço físico, sem os quais este trabalho não teria sido concluído;

Aos professores Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro, Dr. Carlos Ueira Vieira e Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior pelas sugestões durante a minha qualificação;

Aos professores do PPIPA que contribuíram para a minha formação;

Às secretárias do PPIPA Luceleide e Lucélia pela atenção e disponibilidade de sempre;

Aos membros da banca examinadora: Dra. Divina das Dôres de Paula Cardoso, Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro e Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz pela participação e contribuição na minha dissertação;

E por fim, a todos aqueles que não foram citados, mas que sempre torceram por mim e me influenciaram positivamente.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

+ssRNA – RNA de fita simples polaridade positiva

AdV - Adenovírus

ANF – Aspirado de nasofaringe

cDNA – DNA complementar

DRA – Doença respiratória aguda

DTRI – Doença do trato respiratório inferior

DTRS – Doença do trato respiratório superior

FLU – Influenzavírus

hBoV – Bocavírus humano

HCU – Hospital de Clínicas de Uberlândia

hMPV – Metapneumovírus humano

HRV – Rinovírus humanos

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1

IFI – Imunofluorescência indireta

IL – Interleucina

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

mRNA – RNA mensageiro

nt - nucleotídeo

PIV – Parainfluenzavírus

RT-PCR – Transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase

TBE – Tris-Borato-EDTA

TNF – Fator de necrose tumoral

VRS – Vírus respiratório sincicial

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
2. Objetivos	7
3. Material e métodos	8
3.1. Pacientes e espécimes clínicos	8
3.2. Extração de ácido nucléico do tipo RNA dos ANFs	9
3.3. RT-PCR para detecção dos HRV	10
3.4. RT-PCR para detecção de co-infecção de HRV com outros vírus respiratórios	11
3.4.1. RT-PCR para detecção do VRS A e B	15
3.4.2. RT-PCR para detecção dos FLU A (H3 e H1) e B	16
3.4.3. RT-PCR para detecção dos hMPV	17
3.4.4. RT-PCR para detecção dos PIV 1, 2 e 3	18
3.5. Análise estatística	19
4. Resultados	20
5. Discussão	24
6. Conclusões	27
7. Referências Bibliográficas	28
ANEXO I	36
ANEXO II	38
ANEXO III	39

Resumo

Os rinovírus humanos (HRV) são comumente associados com sintomas respiratórios brandos de crianças. No entanto, alguns estudos têm detectado esses vírus em casos de doenças do trato respiratório inferior (DTRI), muitas vezes em co-infecção com outros agentes virais. Assim, tanto se investigou a infecção simultânea desses agentes com outros vírus respiratórios, como uma possível associação com DTRI, em amostras de crianças positivas para HRV atendidas em Serviços de Saúde Pública de Uberlândia, MG, Brasil. A presença de RNA desses vírus foi pesquisada por reação em cadeia pela polimerase (PCR), precedida por uma transcrição reversa (RT), em 321 amostras de aspirado de nasofaringe (ANFs) de crianças <5 anos de idade, com doença respiratória aguda, que apresentavam resultado negativo ou inconclusivo para sete vírus respiratórios, pela imunofluorescência indireta. Desse total, selecionou-se 90 espécimes que apresentaram resultado positivo para os HRV e diagnóstico de DTRI, e os mesmos foram testados por PCR para a presença de vírus respiratório sincicial (VRS) tipos A e B, influenzavírus (FLU) A e B, metapneumovírus humano (hMPV) e parainfluenzavírus (PIV) 1, 2 e 3. As DTRI foram classificadas em bronquiolite, pneumonia e bronquite aguda, sendo as duas primeiras consideradas síndromes clínicas de maior gravidade em relação a essa última. Em 64,4% das amostras nenhum dos outros vírus investigados foi detectado. No restante dos espécimes clínicos, um segundo vírus foi encontrado, sendo o VRS em 22,2%, os hMPV em 6,7% e os PIV em 6,7%. Uma maior incidência de casos de bronquiolite foi observada em crianças que tinham co-infecção de HRV com hMPV ou com PIV, comparado àquelas que apresentavam somente HRV ($p = 0,0364$). Crianças mais jovens foram as mais frequentemente identificadas com infecção dupla, e também as que apresentaram maior índice de hospitalização. A relação da co-infecção de HRV com determinados vírus respiratórios e uma maior frequência de bronquiolite sugere que, os HRV quando associados a outros agentes respiratórios virais podem causar quadros clínicos mais graves. O fato de crianças de tenra idade terem sido mais frequentemente co-infectadas sugere que a idade parece ter um papel importante na infecção simultânea entre os HRV e outros vírus respiratórios.

Abstract

Human rhinoviruses (HRV) are commonly associated with mild respiratory symptoms of children. However, some studies have detected these viruses in lower respiratory tract illness (LRTI), often in coinfection with other respiratory agents. So, both investigated simultaneous infections of these agents with other respiratory viruses as a possible association with LRTI, in rhinovirus-positive samples of children attended at a public health service in Uberlândia, MG, Brazil. The presence of RNA of these viruses was researched by polymerase chain reaction (PCR), preceded by reverse transcription (RT), in 321 nasopharyngeal aspirates (NPAs) samples from children <5 yo. with acute respiratory disease (ARD), which presented negative or inconclusive results for seven respiratory viruses by immunofluorescence assay. Of these total, 90 specimens with positive results for HRV and presenting LRTI diagnose, were selected to be tested by PCR for presence of respiratory syncytial virus (RSV) types A and B, influenzaviruses (FLU) A and B, human metapneumovirus (hMPV) and parainfluenzaviruses (PIV) 1, 2 and 3. The LRTI were classified into: bronchiolitis, pneumonia and acute bronchitis. Bronchiolitis and pneumonia were considered more severe than acute bronchitis. In 64.4% of samples any other investigated viruses were detected. In the remaining of clinical specimens, a second virus were found, including RSV in 22.2%, followed by hMPV in 6.7%, and PIV in 6.7%. A higher incidence of bronchiolitis was observed in children that had HRV coinfection with hMPV or PIV, compared with those presenting only HRV ($p = 0.0364$). Younger children were the most frequently identified with dual infection, and also presented higher rates of hospitalization. The relation between HRV coinfection with certain viruses and a higher frequency of bronchiolitis suggests that HRV could cause more severe clinical syndromes, when associated with some other respiratory viral agents. The fact that younger children had been more often coinfecting suggests that age has an important role in the simultaneous infection of HRV with other respiratory viruses.

1. Introdução

Os rinovírus humanos (HRV) são agentes comumente associados com doenças do trato respiratório superior (DTRS) de caráter brando, mas também têm sido relacionados com exacerbações de asma – considerados desencadeadores de chiado em crianças que apresentam atopia (Gern e Busse, 1999, Costa et al., 2006, Manoha et al., 2007, Kelly e Busse, 2008, Mackay, 2008, Jartti et al., 2009). Além disso, alguns estudos demonstram a presença desses vírus em crianças com doenças do trato respiratório inferior (DTRI) (Jacques et al., 2006), motivo frequente de prescrição de antibióticos (Arden e Mackay, 2009).

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), os HRV pertencem à família *Picornaviridae*, gênero *Rinovirus* e se subdividem em três espécies: A, B, e a recentemente identificada C (Lau et al., 2007, Mackay, 2008, Palmenberg et al., 2009). Esses vírus não possuem envelope e o genoma do tipo RNA de aproximadamente 7200 nucleotídeos (nt) apresenta fita simples e polaridade positiva (+ssRNA), que funciona como RNA mensageiro (mRNA), podendo ser traduzido assim que for liberado dentro da célula hospedeira. Esse RNA é composto de 11 genes, que são traduzidos em uma única poliproteína de três regiões (P1, P2 e P3), que é subsequentemente clivada em quatro proteínas estruturais maduras (VP4, VP2, VP3 e VP1) e sete não-estruturais (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C^{PRO}, 3D^{POL}) (Kirchberger et al., 2007, Kistler et al., 2007, Mackay, 2008, Lewis-Rogers et al., 2009) (Figura 1).

As proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3 estão localizadas na superfície do vírus e são responsáveis pela diversidade antigênica viral, sendo que a VP1 é identificada por conter o maior número de epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes. Já a proteína VP4 está localizada no interior do vírus e apresenta a função de ancorar o ácido nucléico central ao capsídeo (Kelly e Busse, 2008, Lewis-Rogers et al., 2009).

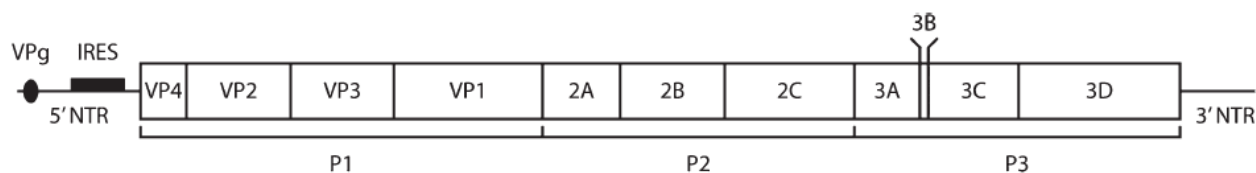


Figura 1: Organização genômica dos HRV demonstrando os seus 11 genes (Lewis-Rogers et al., 2009). P1 representa uma região da poliproteína viral que dará origem às proteínas estruturais, e P2 e P3 representam as regiões que darão origem a proteínas não estruturais

No que diz respeito aos receptores de entrada dos HRV em células hospedeiras, a maior parte dos sorotipos conhecidos se utilizam da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1). Um grupo menor se utiliza do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Kelly e Busse, 2008, Mackay, 2008). A síntese de RNA e de partículas virais atinge um pico em torno de 48-72 horas e declina depois disso. A rápida propagação e replicação desses agentes é uma das armas mais poderosas para o escape do sistema imune do hospedeiro, uma vez que títulos relevantes de anticorpos são produzidos somente 3-4 dias após a infecção (Dreschers et al., 2007).

A infecção por HRV é acompanhada da liberação de mediadores solúveis, particularmente citocinas pró-inflamatórias incluindo interleucina (IL) -1, IL-8, IL-6, IL-11 e fator de necrose tumoral (TNF). Consequentemente, leucócitos, granulócitos, células dendríticas e monócitos migram para o sítio da infecção (Kirchberger et al., 2007, Kelly e Busse, 2008). Além disso, quimiocinas como RANTES (Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais) e MCP-1 (Proteína quimioatraente de monócitos -1) também são liberadas durante a infecção. Esses vírus são responsáveis ainda pela indução de proteína 10 – induzida por interferon- γ (IP-10), um quimioatraente que parece desempenhar um importante papel na patofisiologia das infecções causadas por esses agentes (Spurrell et al., 2005, Kirchberger et al., 2007).

Alguns autores sugerem que a participação dos HRV em doenças respiratórias é subestimada (Paranhos-Baccala et al., 2008, Arden e Mackay, 2009) por dificuldade de isolamento em culturas celulares (Andeweg et al., 1999, Cheuk et al., 2007, Jartti et al., 2009) e pelo fato de existirem aproximadamente 100 diferentes sorotipos (Arden e Mackay, 2009). Argumentam que o diagnóstico imunológico é impraticável, porém, com o desenvolvimento de técnicas moleculares para a amplificação de ácidos nucleicos, a participação desses agentes em DTRI de crianças tem sido mais frequentemente demonstrada (Choi et al., 2006, Miller et al., 2007, Banerji et al., 2009, Gerna et al., 2009, Louie et al., 2009). A disponibilidade de métodos mais sensíveis, por outro lado, demonstra a presença de RNA dos HRV em diferentes sítios, e não somente no trato respiratório (Tapparel et al., 2009).

Esses patógenos têm sido comumente detectados em crianças com diagnóstico clínico de bronquiolite e pneumonia (Manoha et al., 2007, Miller et al., 2007, Louie et al., 2009), e desempenham um importante papel em pacientes imunocomprometidos (Malcolm et al., 2001), ou naqueles que apresentam doenças crônicas de base (Kim e Hodinka, 1998, Glezen et al., 2000, Cheuk et al., 2007, Dreschers et al., 2007). Por outro lado, considerando que os HRV podem também ser detectados em crianças que não apresentam sintoma de doença respiratória, foi sugerido que o sistema imune do hospedeiro, provavelmente desempenha um importante papel na patogenicidade desses vírus (van der Zalm et al., 2009).

A utilização de métodos moleculares na detecção viral contribui para a identificação de casos de co-infecção entre os HRV e outros vírus respiratórios (Aberle et al., 2005, Jacques et al., 2006, Calvo et al., 2008), sendo principalmente estudados em associação com o vírus respiratório sincicial (VRS) (Papadopoulos et al., 2002, Miller et al., 2007, Paranhos-Baccala et al., 2008, Marguet et al., 2009), com os metapneumovírus humanos (hMPV), com os parainfluenzavírus (PIV), os influenzavírus (FLU), os bocavírus humanos (hBoV), os adenovírus

(AdV) e enterovírus (Drews et al., 1997, Aberle et al., 2005, Calvo et al., 2007, Manoha et al., 2007, Cilla et al., 2008, Banerji et al., 2009).

No entanto, além de esses estudos serem relativamente poucos, têm se levantado questões controversas em relação à frequência com que estas co-infecções ocorrem; e se elas respondem por síndromes clínicas mais graves ou se se relacionam com um período de hospitalização maior; e ainda, se elas ocorrem mais frequentemente em crianças mais jovens (Drews et al., 1997, Papadopoulos et al., 2002, Calvo et al., 2007, Calvo et al., 2008, Richard et al., 2008, Gerna et al., 2009, van der Zalm et al., 2009, Midulla et al., 2010).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar co-infecção entre os HRV e alguns outros vírus respiratórios, em espécimes de aspirado de nasofaringe de crianças com DTRI, obtidos no período de abril de 2000 a julho de 2009. Investigou-se também uma possível associação de co-infecção com bronquiolite, pneumonia e bronquite aguda.

2. Objetivos

- 1- Investigar a presença do vírus respiratório sincicial A e B (VRS A/B), influenzavírus A e B (FLU A/B), metapneumovírus humano (hMPV) e parainfluenzavírus 1, 2 e 3 (PIV 1, 2 e 3) por reação em cadeia pela polimerase (PCR), precedida por uma transcrição reversa (RT), em aspirados de nasofaringe (ANFs) de crianças de 0-5 anos de idade, com doença do trato respiratório inferior que foram positivas para HRV pela PCR precedida por RT, no período de abril de 2000 a julho de 2009, em Uberlândia-MG;
- 2- Investigar se há alguma associação de bronquiolite, pneumonia e bronquite aguda e co-infecção ou infecção única pelos HRV.

3. Material e Métodos

3.1. Pacientes e espécimes clínicos

No período de abril de 2000 a julho de 2009, um total de 552 amostras de aspirado de nasofaringe (ANF) foram coletadas de crianças menores que cinco anos de idade que apresentavam doença respiratória aguda (DRA), com no máximo cinco dias de início dos sintomas, atendidas no Serviço de Saúde Pública de Uberlândia, Minas Gerais (MG). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), de acordo com a resolução de nº 218/09 (Anexo I).

A coleta dos ANFs foi realizada após consentimento prévio dos pais ou responsáveis (Anexo II). Os espécimes clínicos foram obtidos após a instilação de 1mL de soro fisiológico estéril (0,9%) em cada uma das narinas da criança, seguido de aspiração da secreção com um catéter, utilizando-se um sistema de vácuo e transferência para um frasco estéril conforme previamente descrito (Oliveira et al., 2008). No momento da coleta, informações dos pacientes como idade, sexo, diagnóstico clínico e procedência foram obtidas através do preenchimento da ficha clínica pelo pediatra responsável (Anexo III).

Em um período máximo de quatro horas os ANFs foram transportados ao laboratório de virologia da UFU, onde foram processados seguindo parâmetros descritos por Queiróz et al. (2002). Resumidamente, a amostra clínica foi dividida em três alíquotas: i) para a reação de imunofluorescência indireta (IFI); ii) inoculação em cultura de células (CC); e iii) “in natura” para extração de ácidos nucleicos (DNA e RNA), sendo as duas últimas estocadas em freezer -80°C e em tanque de nitrogênio líquido.

Após o processamento, um teste de imunofluorescência indireta (IFI) foi realizado, utilizando-se uma mistura de anticorpos-monoclonais (MAb's) anti-vírus respiratórios (vírus respiratório sincicial, influenzavírus A e B, parainfluenzavírus 1, 2 e 3 e adenovírus) do *Respiratory Panel I Viral Screening and Identification by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) Kit* (Chemicon. Millipore Bedford, MA), conforme instruções do fabricante. A análise dos resultados obtidos seguiu os parâmetros estabelecidos por Queiróz et al. (2002).

3.2. Extração de ácido nucléico do tipo RNA dos ANFs

Um total de 321 espécimes clínicos com resultado negativo ou inconclusivo pela IFI foram testados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), precedida por uma transcrição reversa (RT), para a presença de RNA dos HRV. Os ANFs foram submetidos à extração de RNA pelo método Trizol® (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA), de acordo com instruções do fabricante.

Resumidamente, em um tubo tipo *ependorf* contendo 375µL de trizol adicionou-se 125µL da amostra clínica, sendo esta mistura vigorosamente agitada. Em seguida, adicionou-se 200µL de clorofórmio, a mistura foi novamente agitada e incubada por dois minutos à temperatura ambiente, e então foi realizada uma centrifugação à 12000xg a 4°C /15'. Ao fim da centrifugação, observou-se a formação de três fases, uma fase aquosa menos densa, uma interfase, e uma fase orgânica mais densa.

A fase aquosa, que contém o ácido nucléico do tipo RNA, foi então cuidadosamente transferida para outro tubo *ependorf* ao qual foram adicionados 300µL de isopropanol, sendo a mistura homogeneizada por inversão, incubada por 10 minutos em temperatura ambiente, e centrifugada à 12000xg, 4°C/10'. Posteriormente, o sedimento foi lavado duas vezes com 500µL de etanol 75%, e ao final da segunda lavagem o etanol foi desprezado e o sedimento foi

então ressuspendido em 20µL de água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato) e 0,5µL de inibidor de RNAses (Roche). Sempre que possível, o RNA foi imediatamente transcrito em DNA complementar (cDNA), quando não, este foi armazenado à -80°C.

3.3. Transcrição reversa (RT) e reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção dos rinovírus (HRV)

A síntese do cDNA seguiu parâmetros previamente descritos por Arruda, Hayden (1993), com modificação descrita por Costa et al. (2006). Incialmente, 5µL do RNA total extraído foram adicionados a uma mistura contendo 1µL de dNTPs (10mM), 2µL do iniciador 110822 (10µM) (Tabela 1) e 5µL de água tratada com DEPC, seguido de incubação por 5' à 100°C. Essa mistura foi então adicionada a uma segunda, contendo 4µL de *buffer* 5X *first strand* (Invitrogen), 2µL de 0,1M DTT (Invitrogen), 0,5µL de inibidor de RNAses (Roche) e 0,5µL da enzima *SuperScript*® III - *Reverse transcriptase* (Invitrogen). Posteriormente o tubo foi incubado por 10' à temperatura ambiente, seguido de 60' a 37°C, e então a reação foi finalizada em 100°C/10'.

As condições de amplificação do ácido nucléico pela PCR, bem como a descrição dos iniciadores utilizados, foram realizadas de acordo com Arruda, Hayden (1993). Resumidamente, 5µL do cDNA foram adicionados a uma mistura contendo 5µL de 10X PCR *buffer* Mg⁻ (Invitrogen), 1µL de dNTPs (10mM), 4µL de cada um dos iniciadores 110822 e 110823 (10µM) (Tabela 1), 0,5µL da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 30,5µL de água estéril. As condições do termociclador foram as seguintes: 94°C/3', 40 ciclos de 94°C/30'', 48°C/30'', 72°C/30'', seguido de uma extensão final a 72°C/5'.

Posteriormente, 2µL do produto da PCR, diluídos numa proporção de 1:10 em água estéril, foram adicionados a uma nova mistura para a realização de uma segunda reação de PCR (*nested* PCR). Foram utilizados nessa mistura 3µL de 10X PCR *buffer* Mg⁺ (Invitrogen), 0,6µL de dNTPs (10mM), 0,9µL de cada um dos iniciadores 110824 e 110825 (10µM) (Tabela 1), 0,3µL da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 22,3µL de água estéril.

Finalmente, 10µL dos produtos amplificados foram separados em um gel de agarose 2%, diluído em tampão Tris-borato-EDTA (TBE), e submetidos a uma tensão de 100V por 30'. Após o tempo da corrida eletroforética, o gel foi imerso em solução contendo brometo de etídeo por 15' e visualizado em transiluminador (Loccus®).

3.4. Detecção de co-infecção de HRV com outros vírus respiratórios

O fluxograma da investigação de co-infecção viral é dado na figura 2. Amostras clínicas com resultado positivo para HRV e que apresentavam diagnóstico clínico de doença do trato respiratório inferior (DTRI) foram selecionadas para serem testadas por PCR, precedida por uma RT, para a presença de RNA de quatro patógenos respiratórios virais: (i) Vírus respiratório sincicial A e B (VRS A e B); (ii) Influenzavírus A e B (FLU A e B); (iii) Metapneumovírus humano (hMPV) e (iv) Parainfluenzavírus 1, 2 e 3 (PIV 1-3). Devido à limitação de volume do espécime clínico, amostras que apresentaram co-infecção com um vírus não foram testadas para a presença de um terceiro.

As DTRI foram classificadas de acordo com parâmetros descritos pela Organização Mundial de Saúde (WHO 1994) em: Bronquiolite, pneumonia e bronquite aguda, sendo que as duas primeiras foram consideradas doenças mais graves do que essa última, que foi considerada uma síndrome clínica branda. Além disso, aquelas crianças com bronquiolite e

pneumonia foram avaliadas para a presença ou não de outras condições clínicas associadas que pudessem predispor a uma doença respiratória grave, como prematuridade e/ou doenças crônicas e/ou de base.

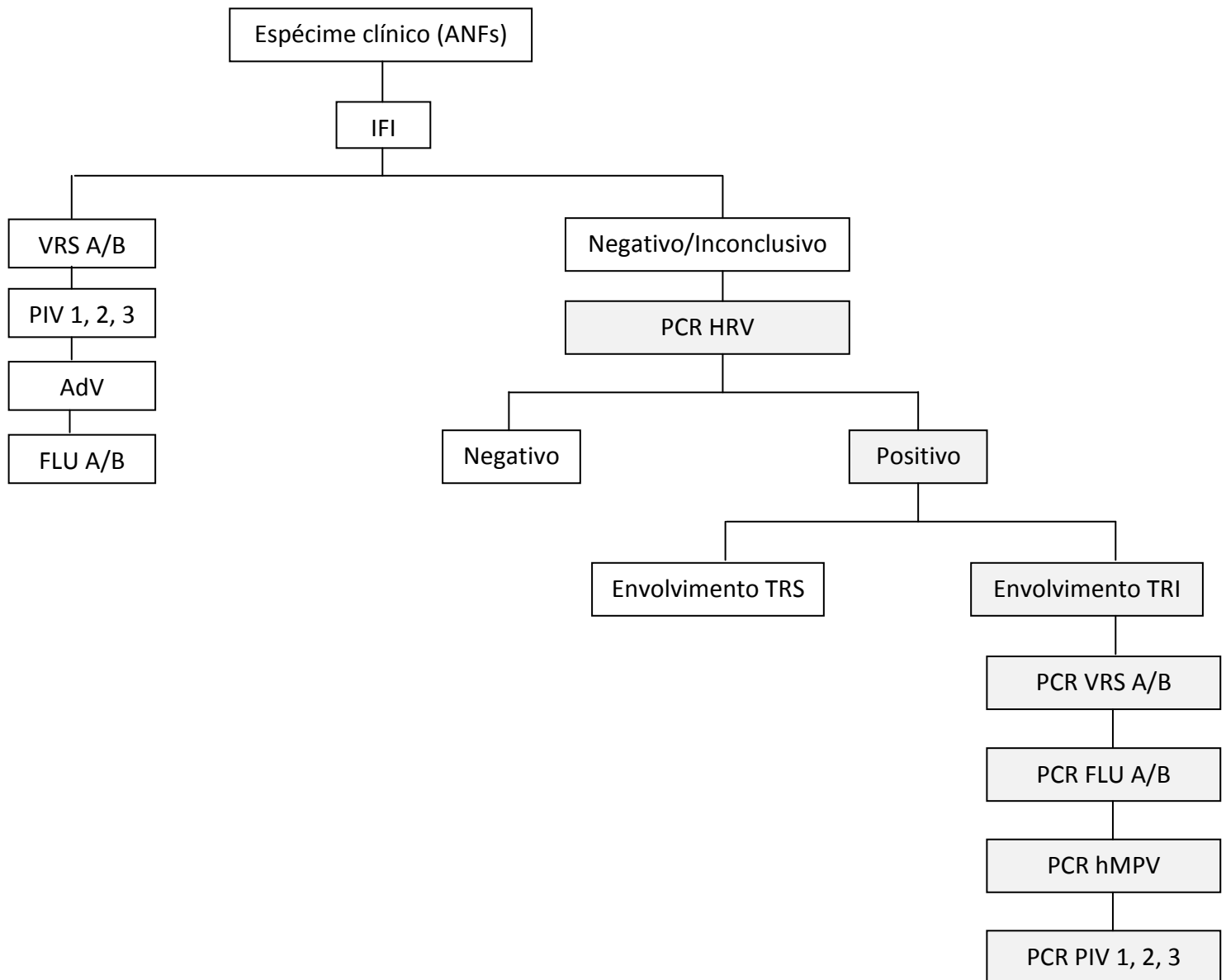


Figura 2: Fluxograma da investigação de co-infecção viral em crianças menores que cinco anos de idade, positivas para rinovírus e que apresentavam doença do trato respiratório inferior. ANFs: Aspirado de nasofaringe; IFI: Imunofluorescência indireta; PCR: Reação em cadeia pela polimerase; HRV: Rinovírus humano; TRS: Trato respiratório superior; TRI: Trato respiratório inferior; VRS: Vírus respiratório sincicial; FLU: Influenzavírus; PIV: Parainfluenzavírus; hMPV: Metapneumovírus humano; AdV: Adenovírus

Tabela 1: Iniciadores usados nas reações em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção dos rinovírus humanos, vírus respiratório sincicial A e B, influenzavírus A e B, metapneumovírus humano e parainfluenzavírus 1, 2 e 3.

Iniciadores ^a	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento (Descrição dos iniciadores)	Gene alvo	Vírus detectado
110822 F ^P	GCACTTCTGTTTCCCC	390 pb (Arruda, Hayden, 1993)	UTR	HRV
110823 R ^P	CGGACACCCAAAGTAG		UTR	
110824 F ^N	AGCCTGCGTGGCTGCC	110 pb (Arruda, Hayden, 1993)	UTR	
110825 R ^N	GCATTCAGGGGCCGGAG		UTR	
RSV AB F ^P	GTCTTACAGCCGTGATTAGG	838 pb (Stockton et al. 1998)	N	VRS A e B
RSV AB R ^P	GGGCTTTCTTTGGTTACTTC		P	
RSV A F ^N	GATGTTACGGTGGGGAGTCT	334 pb (Stockton et al. 1998)	N	
RSV A R ^N	GTACACTGTAGTTAATCACA		N	
RSV B F ^N	AATGCTAAGATGGGGAGTTC	183 pb (Stockton et al. 1998)	N	
RSV B R ^N	GAAATTGAGTTAATGACAGC		N	
N1 F [*]	ATGGGACAAGTGAAAATGTC	928 pb (Mirazo et al. 2005)	N	hMPV
N2 F ^P	GAGTCTCAGTACACAATAA		N	
N3 R ^P	GCATTTCCGAGAACAACAC		N	
S1 F ^N	ACGGGTAGAGAAGAGCTGG	616 pb (Samransamruajkit et al. 2006)	N	
S2 R ^N	GCAAAGTTGGGACAGTTGGC		N	

PIP1 F ^P	CCTTAAATTCAGATATGTAT	317 pb (Echevarria et al. 1998)	HA / NA	PIV 1, 2 e 3
PIP1 R ^P	GATAAATAATTATTGATACG		HA / NA	
PIS 1 F ^N	CCGGTAATTTCTCATACCTATG		HA / NA	
PIS 1 R ^N	CTTTGGAGCGGAGTTGTTAAG		HA / NA	
PIP2 F ^P	AACAATCTGCTGCAGCATTT	203 pb (Echevarria et al. 1998)	HA / NA	
PIP2 R ^P	ATGTCAGACAATGGGCAAAT		HA / NA	
PIS 2 F ^N	CCATTTACCTAAGTGATGGAAT		HA / NA	
PIS 2 R ^N	GCCCTGTTGTATTTGGAAGAGA		HA / NA	
PIP3 F ^P	CTGTAAACTCAGACTTGGTA	102 pb (Echevarria et al. 1998)	HA / NA	FLU A (H3 e H1) e B
PIP3 R ^P	TTTAAGCCCTTGTCACAAC		HA / NA	
PIS 3 F ^N	ACTCCCAAAGTTGATGAAAGAT		HA / NA	
PIS 3 R ^N	TAAATCTTGTTGTTGAGATTG		HA / NA	
AHI A F ^P	CAGATGCAGACACAATATGT	1,015 pb (Ellis et al. 1997)	HA	
AHI FII R ^P	AAACCGGCAATGGCTCCAAA		HA	
AH3 A F ^P	CAGATTGAAGTGAATAATGC	883 pb (Ellis et al. 1997)	HA	
AH3 DII R ^P	GTTTCTCTGGTACATTCCGC		HA	
BHA A F ^P	GTGACTGGTGTGATACCACT	900 pb (Ellis et al. 1997)	HA	
BHA DII R ^P	TGTTTTCACCCATATTGGGC		HA	
AHI B F ^N	ATAGGCTACCATGCGAACAA	944 pb (Ellis et al. 1997)	HA	
AHI EII R ^N	CTTAGTCCTGTAACCATCCT		HA	
AH3 B F ^N	AGCAAAGCTTTCAGCAACTG	591 pb (Ellis et al. 1997)	HA	
AH3 CII R ^N	GCTTCCATTTGGAGTGATGC		HA	
BHA B F ^N	CATTTTGCAAATCTCAAAGC	767 pb (Ellis et al. 1997)	HA	
BHA CII R ^N	TGGAGGCAATCTGCTTCACC		HA	

^a F- forward, R- reverse; *usado para obter o DNA complementar; ^P usado na PCR; ^N usado na nested; UTR: região não traduzida; HA: hemaglutinina; NA: neuraminidase; P: fosfoproteína; N: proteína do nucleocapsídeo; HRV: rinovírus humano; VRS: vírus respiratório sincicial; hMPV: metapneumovírus humano; PIV: parainfluenzavírus; FLU: influenzavírus.

3.4.1. Transcrição reversa (RT) e reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção do VRS A e B

A amplificação de RNA do VRS A e B seguiu parâmetros descritos anteriormente (Stockton et al., 1998) com modificações. Inicialmente, 20µL de RNA total extraído da amostra clínica foram utilizados para a síntese do cDNA sendo adicionados a um tubo contendo a seguinte mistura: 4µL de 10X PCR *buffer* Mg⁻ (Invitrogen), 12µL de MgCl₂ (25mM) (Invitrogen), 6µL de dNTPs (10mM), 0,4µL de iniciador randômico (0,5mM), 0,4µL de inibidor de RNases (Roche) e 0,5µL da enzima *SuperScript*[®] III - *Reverse transcriptase* (Invitrogen). Posteriormente o tubo foi incubado a 37°C/60', seguido de 95°C/5' e por fim 15°C/5'.

Em seguida, 10µL do cDNA foram adicionados a 5 µL de 10X PCR *buffer* Mg⁻ (Invitrogen), 2 µL de MgCl₂ (25mM) (Invitrogen), 5µL de cada um dos iniciadores RSV AB F (5mM) e RSV AB R (5mM) (Tabela 1), 0,25µL da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 22,75µL de água estéril. As condições do termociclador foram: 94°C/2', 35 ciclos de 94°C/1', 50°C/1', 72°C/1', e por fim 15°C/5'. Posteriormente, 2µL do produto da PCR, diluídos numa proporção 1:100 em água estéril, foram adicionados a uma nova mistura para a realização de uma *nested* PCR. Foram utilizados nessa mistura 5µL de 10X PCR *buffer* Mg⁻ (Invitrogen), 2µL de MgCl₂ (25mM) (Invitrogen), 1µL de cada um dos iniciadores RSV A F (25mM), RSV A R (25mM), RSV B F (25mM) e RSV B R (25mM) (Tabela 1), 1µL de dNTPs (10mM), 0,25µL da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 35,75µL de água estéril. As condições do termociclador foram as mesmas utilizadas na PCR.

Os produtos da PCR foram visualizados em um gel de agarose 2%, diluído em TBE, e submetidos a uma tensão de 100V por 35'. Em seguida, o gel foi imerso em uma solução contendo brometo de etídeo por 15' e visualizado em transiluminador (Loccus[®]).

3.4.2. Transcrição reversa (RT) e reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção dos FLU A (H3 e H1) e B

As amostras clínicas com resultado negativo para o VRS foram testadas para a presença de RNA dos FLU A (H3 e H1) e B de acordo com Stockton et al. (1998) com modificações. As condições de síntese do cDNA, e as condições do termociclador durante toda a reação foram as mesmas utilizadas para a detecção do VRS. Posteriormente, 20µL do cDNA foram adicionados a 8µL de 10X PCR *buffer* Mg⁻ (Invitrogen), 4µL de MgCl₂ (25mM) (Invitrogen), 1µL de cada um dos iniciadores A HI A (5mM), A HI FII (5mM), A H3 A (5mM), A H3 DII (5mM), B HA A (5mM) e B HA DII (5mM) (Tabela 1), 0,3µL da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 61,7µL de água estéril.

Para a realização da *nested* PCR, 2µL do produto da PCR foram acrescidos de 5µL de 10X PCR *buffer* Mg⁻ (Invitrogen), 3µL de MgCl₂ (25mM) (Invitrogen), 1µL de dNTPs (10Mm), 1µL de cada um dos iniciadores A HI B (25mM), A HI EII (25mM), A H3 B (25mM), A H3 CII (25mM), B HA B (25mM) e B HA CII (25mM) (Tabela 1), 0,15µL da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 32,85µL de água estéril.

Por fim, a corrida em gel de eletroforese seguiu os mesmos parâmetros utilizados para a detecção do VRS.

3.4.3. Transcrição reversa (RT) e reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção dos hMPV

Amostras com resultado negativo para VRS e para os FLU foram testadas para a presença de RNA dos hMPV, de acordo com o descrito por Carneiro et al. (2009). Para a síntese do cDNA, 5µL do RNA total extraído foram adicionados a uma primeira mistura contendo 1µL de dNTPs (10mM) e 1µL do iniciador N1 (10mM) (Tabela 1), sendo posteriormente incubado a 65°C/5'. Essa mistura foi adicionada a uma segunda, contendo 4µL de *buffer* 5X *first strand* (Invitrogen), 2µL de 0,1M DTT (Invitrogen), 1µL de inibidor de RNAses (Roche), e água tratada com DEPC até se completar o volume de 19µL, seguido de incubação a 42°C/2'. Posteriormente, essa mistura foi acrescida de 0,5µL da enzima *SuperScript® III - Reverse transcriptase* (Invitrogen) e o tubo foi incubado a 42°C/50' e a reação foi finalizada em 72°C/15'.

Cinco microlitros do cDNA foram amplificados através da PCR, tendo a mistura os seguintes reagentes: 5µL de 10X PCR *buffer* Mg⁻ (Invitrogen), 1,5µL de MgCl₂ (50mM) (Invitrogen), 1µL de dNTPs (10mM), 1µL de cada um dos iniciadores N2 (10mM) e N3 (10mM) (Tabela 1), 0,25µL da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 35,25µL de água estéril. As condições do termociclador foram: 94°C/3', 50 ciclos de 94°C/45'', 50°C/30'', 72°C/30'', e por fim 72°C/10'.

Os produtos da PCR foram diluídos numa proporção de 1:10 em água estéril e então submetidos a uma *nested* PCR. A mistura de reagentes e as concentrações dos mesmos para essa reação foram iguais àquelas utilizadas na PCR. No entanto, foram utilizados os iniciadores internos S1 (10mM) e S2 (10mM) e as condições do termociclador foram as seguintes: 95°C/2', 35 ciclos de 95°C/1', 48°C/1', 72°C/1', seguido de 72°C/7' e 25°C/5'.

Os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador (Loccus®) após corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, diluído em TBE e submetido a uma tensão de 100V, e em seguida corado em solução contendo brometo de etídeo por 10'.

3.4.4. Transcrição reversa (RT) e reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção dos PIV 1, 2 e 3

Amostras clínicas negativas para a presença do VRS, dos FLU e dos hMPV foram testadas para a presença dos PIV 1, 2 e 3 de acordo com parâmetros previamente descritos (Echevarria et al., 1998). O cDNA foi sintetizado a partir de 5µL do RNA total extraído, o qual foi adicionado a uma primeira mistura contendo 1µL de dNTPs (10mM), 1µL de cada um dos iniciadores PIP1 F (10mM), PIP2 F (10mM) e PIP3 F (10mM) (Tabela 1) e 1µL de água tratada com DEPC, sendo posteriormente incubado a 65°C/5'. Essa mistura foi adicionada a uma segunda, contendo 4µL de *buffer* 5X *first strand* (Invitrogen), 1µL de 0,1M DTT (Invitrogen), 1µL de inibidor de RNases (Roche), e água tratada com DEPC até se completar o volume de 19µL, seguido de incubação a 42°C por 2'. Posteriormente, essa mistura foi acrescida de 0,5µL da enzima *SuperScript*® III - *Reverse transcriptase* (Invitrogen) e o tubo foi incubado a 50°C/50' e a reação foi finalizada em 70°C/15'.

Para a realização da PCR, 2µL de cDNA foram adicionados a uma mistura contendo 5µL de 10X PCR *buffer* Mg⁻ (Invitrogen), 3µL de MgCl₂ (50mM) (Invitrogen), 1µL de dNTPs (10mM), 1µL de cada um dos iniciadores PIP1 F (10mM), PIP1 R (10mM), PIP2 F (10mM), PIP2 R (10mM), PIP3 F (10mM) e PIP3 R (10mM) (Tabela 1), 0,4µL da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 32,6µL de água estéril. As condições do termociclador foram: 94°C/2', 35 ciclos de 94°C/1', 50°C/1', 72°C/1', e por fim 72°C/5'.

Para a realização de uma *nested* PCR, 1 μ L do produto da PCR foi adicionado à mesma mistura de reagentes da PCR. No entanto, foram utilizados os iniciadores PIS1 F (10mM), PIS1 R (10mM), PIS2 F (10mM), PIS2 R (10mM), PIS3 F (10mM) e PIS3 R (10mM) e 33,6 μ L de água estéril. As condições do termociclador foram as mesmas utilizadas na PCR, com modificação apenas da temperatura de anelamento, a qual passou de 50°C para 58°C.

Por fim, produtos amplificados foram separados por eletroforese em um gel de agarose, nas mesmas condições descritas para os hMPV.

3.5. Análise estatística

A análise dos resultados obtidos foi feita através do programa *Graphpad Prism 4.0* (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). A comparação da mediana de idade entre diferentes grupos foi realizada pelo teste *U* de *Mann-Whitney*, e o teste exato de Fisher foi utilizado para analisar diferenças entre as manifestações clínicas de crianças com infecção simples e co-infecção. Diferenças apresentando valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

4. Resultados

No total de 90 espécimes com presença de RNA dos rinovírus (HRV), que apresentavam doença do trato respiratório inferior (DTRI), 58 (64,4%) não apresentaram co-infecção com nenhum dos vírus aqui investigados. No restante das amostras, um segundo vírus foi detectado, sendo o vírus respiratório sincicial (VRS) em 22,2% (20/90), os metapneumovírus humanos (hMPV) em 6,7% (6/90) e os parainfluenzavírus (PIV) em 6,7% (6/90) – incluindo três casos de PIV-1 e três de PIV-2. Co-infecções com os PIV-3 e influenzavírus A e B não foram detectadas (Figura 3).

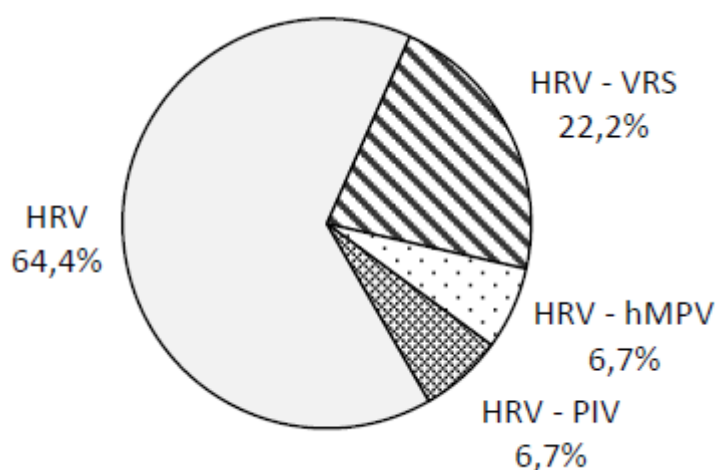


Figura 3: Distribuição dos casos de co-infecção em crianças apresentando doença do trato respiratório inferior, detectados por transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase em amostras clínicas obtidas no período de 2000 a 2009 em Serviço de Saúde Pública de Uberlândia, MG. HRV: rinovírus humano; VRS: vírus respiratório sincicial; hMPV: metapneumovírus humano; PIV: Parainfluenzavírus

A manifestação clínica mais frequentemente observada nas 90 crianças com DTRI foi a bronquiolite, respondendo por aproximadamente 44,5% (40/90) dos casos, seguido por bronquite aguda em 43,3% (39/90) e pneumonia em 12,2% (11/90). O diagnóstico de bronquiolite também foi mais observado no total de casos de co-infecção (19/32) quando

comparado com os que tinham apenas os HRV (21/58) ($p = 0,0464$). Da mesma forma, essa doença foi mais frequente nos casos de infecção simultânea de HRV com hMPV ou com PIV comparado aqueles que tinham infecção somente pelos HRV (83,3% versus 36,2%, $p = 0,0364$) (Tabela 2). Por outro lado, síndrome clínica mais branda do tipo bronquite aguda foi mais comum em crianças infectadas somente com HRV ($p = 0,0140$).

Tabela 2: Distribuição do gênero e manifestação clínica de crianças menores que cinco anos de idade apresentando doença do trato respiratório inferior, infectadas somente por rinovírus ou co-infectadas com outros vírus respiratórios, atendidas em Serviço de Saúde Pública de Uberlândia, MG, Brasil.

Vírus detectados	Nº de pacientes (%)	Gênero M (%)	Gênero F (%)	Manifestação clínica (%)		
				Bronquiolite	Pneumonia	Bronquite aguda
Rinovírus	58 (64,4)	30 (51,7)	28 (48,3)	21 (36,2) ^{†*}	6 (10,4)	31 (53,4) [†]
Co-infecção	32 (35,6)	17(53,1)	15 (46,9)	19 (59,4) [†]	5 (15,6)	8 (25,0) [†]
VRS	20 (22,2)	10 (50,0)	10 (50,0)	9 (45,0)	5 (25,0)	6 (30,0)
hMPV	6 (6,7)	5 (83,3)	1 (16,7)	5 (83,3)*	0	1 (16,7)
PIV	6 (6,7)	2 (33,3)	4 (66,7)	5 (83,3)*	0	1 (16,7)
Total	90 (100)	47 (52,2)	43 (47,8)	40 (44,5)	11 (12,2)	39 (43,3)

VRS: Vírus respiratório sincicial; hMPV: metapneumovírus humano; PIV: parainfluenzavírus; M: masculino; F: feminino; * Estatisticamente significante ($p < 0,05$) - comparação entre rinovírus e co-infecção com VRS, hMPV e PIV. [†] Estatisticamente significante ($p < 0,05$) – comparação entre rinovírus e o total de casos de co-infecção.

Ainda referente às manifestações clínicas, pacientes com diagnóstico de bronquiolite e pneumonia foram avaliados para a presença ou não de outras condições clínicas associadas, tais como prematuridade e doenças crônicas e de base, que pudessem predispor a uma

doença respiratória grave. Nenhuma dessas condições foi observada em 63,0% (17/27) dos casos que apresentaram apenas os HRV e em 75,0% (18/24) dos co-infetados.

Em relação à mediana de idade, infecção simultânea entre HRV e PIV foi mais frequentemente identificada nas crianças mais jovens quando comparado com as infectadas somente por HRV ($p = 0,0308$). O mesmo foi observado na co-infecção entre HRV e VRS quando comparado com as que tiveram infecção somente por HRV, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,0518$). Em adição, considerando-se todas as crianças com co-infecção, a mediana de idade de 2,5 meses foi estatisticamente diferente das que apresentaram somente os HRV ($p = 0,0259$) (Figura 4).

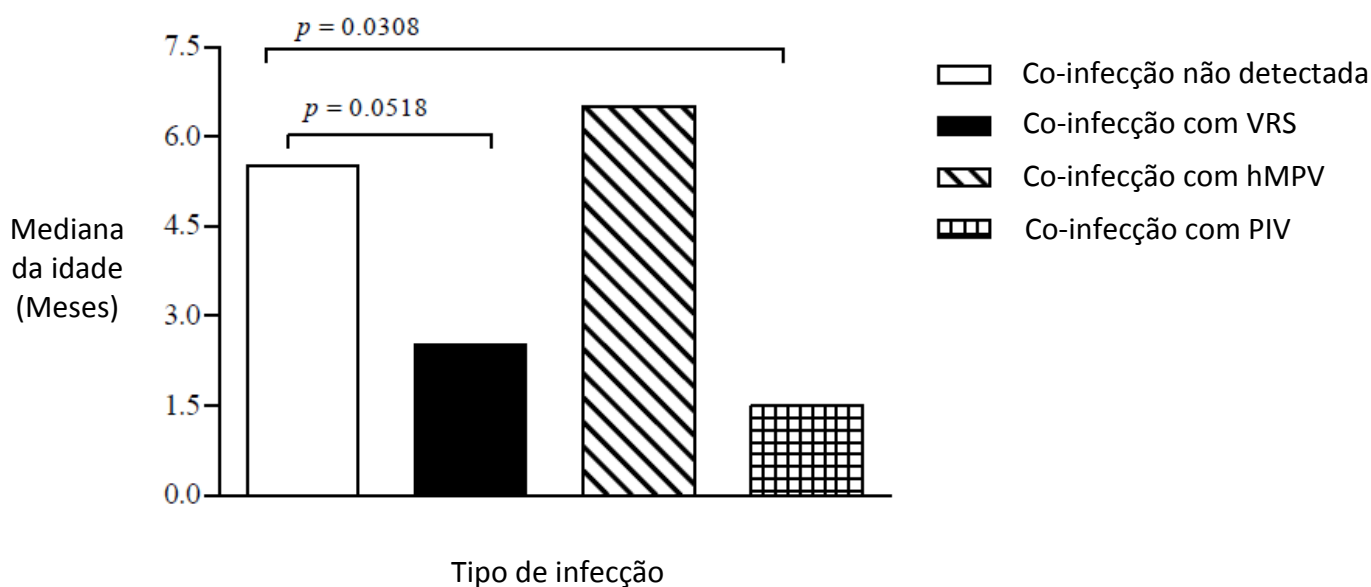


Figura 4: Distribuição da idade das crianças, com doença do trato respiratório inferior, que apresentaram infecção única pelos rinovírus (co-infecção não detectada) ou co-infecção com outros vírus respiratórios, em Uberlândia, MG, Brasil. HRV: rinovírus humano; VRS: vírus respiratório sincicial; hMPV: metapneumovírus humano; PIV: parainfluenzavírus

Em termos da necessidade de hospitalização dos pacientes, não foi encontrado diferença estatística na frequência com que estas ocorreram entre o grupo com infecção

simples e o grupo co-infectado. Já em relação aos pacientes infectados somente pelos HRV, as crianças hospitalizadas eram mais jovens do que as não hospitalizadas (mediana de idade de 4 meses e 9 meses, respectivamente; $p = 0,0045$). O mesmo foi observado para o total de crianças que apresentaram co-infecção (mediana de idade de 2 meses e 7 meses, respectivamente; $p = 0,0039$) e isso se repetiu para aquelas com infecção simultânea entre HRV e VRS (mediana de 2 meses e 29 meses, respectivamente; $p = 0,0098$).

Uma associação entre síndromes clínicas e idade revelou que crianças com bronquiolite foram significativamente mais jovens do que aquelas que apresentavam quadros clínicos mais brandos ($p < 0,0001$).

5. Discussão

O índice de co-infecção entre os rinovírus (HRV) e os outros vírus respiratórios, encontrado em crianças menores de cinco anos de idade, com doença do trato respiratório inferior (DTRI), de Uberlândia, MG, foi próximo ao observado por outros pesquisadores (Calvo et al., 2007, Cilla et al., 2008). A evidência de co-infecção mais frequente entre os HRV e o VRS também está de acordo com outros estudos (Paranhos-Baccala et al., 2008, Richard et al., 2008, Gerna et al., 2009). Particularmente em nossa região, talvez isto seja devido à sazonalidade desses dois vírus, que apresentaram picos de incidência muito próximos, já referido em dois outros estudos (Costa et al., 2006, Oliveira et al., 2008).

A gravidade da doença observada em 37,0% das crianças, que apresentaram unicamente os HRV, pode ser explicada pelo fato de essas crianças terem outras condições clínicas associadas, como prematuridade, baixo peso ao nascer e/ou presença de doenças crônicas / congênitas – fatores predisponentes ao desenvolvimento de DTRI em crianças (Coffin et al., 2007, Rossi et al., 2007, Banerji et al., 2009). Porém, considerando os 63,0% dos pacientes que não carregavam nenhum desses fatores, a gravidade poderia estar relacionada à espécie HRV-C, recentemente associada a um elevado nível de gravidade clínica em crianças (Piralla et al., 2009). Outro possível aspecto seria uma maior carga viral desses vírus (Gerna et al., 2009), ou ainda, a co-infecção com outros vírus que não foram investigados (Cilla et al., 2008, Midulla et al., 2010).

Alguns trabalhos têm sugerido que a presença simultânea de mais de um patógeno viral em doença respiratória aguda pode não estar relacionada com uma manifestação clínica mais grave (Choi et al., 2006, Calvo et al., 2007, Louie et al., 2009). No entanto, nossos resultados demonstraram que a co-infecção viral em casos com DTRI pode estar relacionada à maior frequência de bronquiolite do que bronquite aguda, e resultados similares aos nossos têm sido

mostrados por outros grupos (Aberle et al., 2005, Cilla et al., 2008, Van der Zalm et al., 2009). Richard et al. (2008) sugeriram que a infecção simultânea por dois vírus constitui um fator de risco relevante para o curso clínico da doença respiratória, independente das condições do hospedeiro. Além disso, em relação à co-infecção entre os HRV e o VRS, Aberle et al. (2005) demonstraram uma maior frequência de síndromes clínicas graves, quando comparado com a presença única dos HRV, o que também foi observado por Marguet et al. (2009).

Especificamente sobre a associação HRV-VRS, nossos resultados não demonstraram diferença estatística na frequência de doença grave quando comparado com os casos em que se detectaram somente os HRV. Talvez seja devido à participação dos HRV do tipo C – encontrados em pacientes pediátricos com quadros clínicos mais graves (Piralla et al., 2009), porém o tipo de HRV não foi determinado neste estudo.

A maior parte dos trabalhos investigados não demonstrou nenhuma relação entre co-infecção e crianças de menor faixa etária (Calvo et al., 2007, Cheuk et al., 2007, Bonzel et al., 2008, Calvo et al., 2008), ao contrário do observado neste estudo, onde as infecções simultâneas foram frequentemente associadas às crianças de tenra idade. Um outro estudo sugeriu que o fato de as crianças mais jovens serem mais acometidas por múltiplos agentes virais pode estar relacionado ao sistema imune dessas crianças, menos desenvolvido que o das mais velhas (Van der Zalm et al., 2009). Em adição, Miller et al. (2007) mostraram que crianças mais jovens infectadas por HRV, tem sido mais frequentemente hospitalizadas do que as de faixa etária mais elevada.

Louie et al. (2009) observaram que crianças infectadas somente pelos HRV são frequentemente admitidas em unidades de terapia intensiva. Talvez isso explique o fato de a frequência de internação dos casos com e sem co-infecção terem sido semelhantes, neste estudo.

Alguns outros estudos têm mostrado os PIV e os hMPV em co-infecções com o VRS, acarretando síndromes graves em crianças (Semple et al., 2005, Richard et al., 2008). Neste estudo, casos de bronquiolite foram mais freqüentes do que os de bronquite aguda, quando esses mesmos vírus, ou seja, PIV e hMPV foram detectados em co-infecção com HRV. Em relação à associação HRV-PIV, talvez a idade de um mês e meio das crianças tenha relação com essa gravidade, visto que casos de co-infecção envolvendo os PIV foram referidos em crianças mais velhas (Cilla et al., 2008). Por outro lado, co-infecção entre HRV e hMPV foi aqui observada em crianças de maior faixa etária (mediana de 6,5 meses), e esses casos foram frequentemente acompanhados por uma maior gravidade clínica. Recentemente, nosso grupo mostrou que infecções por hMPV foram mais comumente encontradas em crianças mais velhas, comparado a outros estudos, porém geralmente envolvendo o trato respiratório superior (Carneiro et al., 2009).

O fato de esta pesquisa ter envolvido apenas crianças que apresentavam DTRI, pode provavelmente explicar a não detecção de co-infecção dos HRV com os influenzavírus (FLU). Esses agentes têm sido frequentemente referidos em crianças mais velhas e com sintomas brandos do trato respiratório superior (Forleo-Neto et al., 2003, Costa et al., 2006).

Técnicas moleculares mais sensíveis e específicas têm permitido a investigação dos HRV, que não são detectados pelo ensaio de imunofluorescência e que, portanto, podem assim ser subestimados (Miller et al., 2007, Bonzel et al., 2008, Paranhos-Baccala et al., 2008). Os adenovírus humanos (AdV), bocavírus humanos (hBoV), PIV-4, coronavírus humanos (hCoV) e outros vírus respiratórios não foram incluídos nesta pesquisa e a adição deles certamente aumentaria a incidência de co-infecção. Além disso, estudos adicionais são necessários para avaliar o verdadeiro papel de cada agente viral em casos de infecções simultâneas.

6. Conclusões

O fato de 63,0% dos casos, positivos somente para HRV, apresentarem uma doença respiratória grave e não carregarem nenhuma condição predisponente à doenças do trato respiratório inferior, sugere o envolvimento de uma espécie mais patogênica desses vírus na doença. Por outro lado, a relação da co-infecção de HRV com determinados vírus respiratórios e uma maior frequência de bronquiolite sugere que, os rinovírus quando associados a outros agentes respiratórios virais, podem causar quadros clínicos mais graves. Em adição, o fato de crianças de tenra idade terem sido mais frequentemente co-infectadas sugere que a idade parece ter um papel importante na infecção simultânea entre os HRV e outro vírus respiratórios.

7. Referências Bibliográficas

- Aberle, J. H., Aberle, S. W., Pracher, E., Hutter, H. P., Kundi, M. & Popow-Kraupp, T. Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on clinical course of disease and interferon-gamma response. **Pediatr Infect Dis J**, 24, 605-10.2005.
- Andeweg, A. C., Bestebroer, T. M., Huybreghs, M., Kimman, T. G. & de Jong, J. C. Improved detection of rhinoviruses in clinical samples by using a newly developed nested reverse transcription-PCR assay. **J Clin Microbiol**, 37, 524-30.1999.
- Arden, K. E. & Mackay, I. M. Human rhinoviruses: coming in from the cold. **Genome Med**, 1, 44.2009.
- Arruda, E. & Hayden, F. G. Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR. **Mol Cell Probes**, 7, 373-9.1993.
- Banerji, A., Greenberg, D., White, L. F., Macdonald, W. A., Saxton, A., Thomas, E., Sage, D., Mamdani, M., Lanctot, K. L., Mahony, J. B., Dingle, M. & Roberts, A. Risk factors and viruses associated with hospitalization due to lower respiratory tract infections in Canadian Inuit children : a case-control study. **Pediatr Infect Dis J**, 28, 697-701.2009.
- 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**, 27, 589-94.2008.
- Calvo, C., Garcia-Garcia, M. L., Blanco, C., Pozo, F., Flecha, I. C. & Perez-Brena, P. Role of rhinovirus in hospitalized infants with respiratory tract infections in Spain. **Pediatr Infect Dis J**, 26, 904-8.2007.

- Calvo, C., Garcia-Garcia, M. L., Blanco, C., Vazquez, M. C., Frias, M. E., Perez-Brena, P. & Casas, I. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. **J Clin Virol**, 42, 268-72.2008.
- Carneiro, B. M., Yokosawa, J., Arbiza, J., Costa, L. F., Mirazo, S., Nepomuceno, L. L., Oliveira, T. F., Goulart, L. R., Vieira, C. U., Freitas, G. R., Paula, N. T. & Queiroz, D. A. Detection of all four human metapneumovirus subtypes in nasopharyngeal specimens from children with respiratory disease in Uberlandia, Brazil. **J Med Virol**, 81, 1814-8.2009.
- Cheuk, D. K., Tang, I. W., Chan, K. H., Woo, P. C., Peiris, M. J. & Chiu, S. S. Rhinovirus infection in hospitalized children in Hong Kong: a prospective study. **Pediatr Infect Dis J**, 26, 995-1000.2007.
- Choi, E. H., Lee, H. J., Kim, S. J., Eun, B. W., Kim, N. H., Lee, J. A., Lee, J. H., Song, E. K., Kim, S. H., Park, J. Y. & Sung, J. Y. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. **Clin Infect Dis**, 43, 585-92.2006.
- Cilla, G., Onate, E., Perez-Yarza, E. G., 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**, 80, 1843-9.2008.
- Coffin, S. E., Zaoutis, T. E., Rosenquist, A. B., Heydon, K., Herrera, G., Bridges, C. B., Watson, B., Localio, R., Hodinka, R. L. & Keren, R. Incidence, complications, and risk factors for prolonged stay in children hospitalized with community-acquired influenza. **Pediatrics**, 119, 740-8.2007.
- Costa, L. F., Yokosawa, J., Mantese, O. C., Oliveira, T. F., Silveira, H. L., Nepomuceno, L. L., Moreira, L. S., Dyonisio, G., Rossi, L. M., Oliveira, R. C., Ribeiro, L. Z. & Queiroz, D. A. 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**, 101, 301-6.2006.
- Dreschers, S., Dumitru, C. A., Adams, C. & Gulbins, E. The cold case: are rhinoviruses perfectly adapted pathogens? **Cell Mol Life Sci**, 64, 181-91.2007.
- Drews, A. L., Atmar, R. L., Glezen, W. P., Baxter, B. D., Piedra, P. A. & Greenberg, S. B. Dual respiratory virus infections. **Clin Infect Dis**, 25, 1421-9.1997.
- Echevarria, J. E., Erdman, D. D., Swierkosz, E. M., Holloway, B. P. & Anderson, L. J. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, 36, 1388-91.1998.
- Forleo-Neto, E., Halker, E., Santos, V. J., Paiva, T. M. & Toniolo-Neto, J. Influenza. **Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.**, 36, 267-274.2003.
- Gern, J. E. & Busse, W. W. Association of rhinovirus infections with asthma. **Clin Microbiol Rev**, 12, 9-18.1999.
- Gerna, G., Piralla, A., Roviola, F., Rognoni, V., Marchi, A., Locatelli, F. & Meloni, F. Correlation of rhinovirus load in the respiratory tract and clinical symptoms in hospitalized immunocompetent and immunocompromised patients. **J Med Virol**, 81, 1498-507.2009.
- Glezen, W. P., Greenberg, S. B., Atmar, R. L., Piedra, P. A. & Couch, R. B. Impact of respiratory virus infections on persons with chronic underlying conditions. **JAMA**, 283, 499-505.2000.
- Jacques, J., Bouscambert-Duchamp, M., Moret, H., Carquin, J., Brodard, V., Lina, B., Motte, J. & Andreoletti, L. Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. **J Clin Virol**, 35, 463-6.2006.

- Jartti, T., Paul-Anttila, M., Lehtinen, P., Parikka, V., Vuorinen, T., Simell, O. & Ruuskanen, O. Systemic T-helper and T-regulatory cell type cytokine responses in rhinovirus vs. respiratory syncytial virus induced early wheezing: an observational study. **Respir Res**, 10, 85.2009.
- Kelly, J. T. & Busse, W. W. Host immune responses to rhinovirus: mechanisms in asthma. **J Allergy Clin Immunol**, 122, 671-82; quiz 683-4.2008.
- Kim, J. O. & Hodinka, R. L. Serious respiratory illness associated with rhinovirus infection in a pediatric population. **Clin Diagn Virol**, 10, 57-65.1998.
- Kirchberger, S., Majdic, O. & Stockl, J. Modulation of the immune system by human rhinoviruses. **Int Arch Allergy Immunol**, 142, 1-10.2007.
- Kistler, A. L., Webster, D. R., Rouskin, S., Magrini, V., Credle, J. J., Schnurr, D. P., Boushey, H. A., Mardis, E. R., Li, H. & DeRisi, J. L. Genome-wide diversity and selective pressure in the human rhinovirus. **Virol J**, 4, 40.2007.
- Lau, S. K., Yip, C. C., Tsoi, H. W., Lee, R. A., So, L. Y., Lau, Y. L., Chan, K. H., Woo, P. C. & Yuen, K. Y. Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. **J Clin Microbiol**, 45, 3655-64.2007.
- Lewis-Rogers, N., Bendall, M. L. & Crandall, K. A. Phylogenetic relationships and molecular adaptation dynamics of human rhinoviruses. **Mol Biol Evol**, 26, 969-81.2009.
- Louie, J. K., Roy-Burman, A., Guardia-Labar, L., Boston, E. J., Kiang, D., Padilla, T., Yagi, S., Messenger, S., Petru, A. M., Glaser, C. A. & Schnurr, D. P. Rhinovirus associated with severe lower respiratory tract infections in children. **Pediatr Infect Dis J**, 28, 337-9.2009.

- Mackay, I. M. Human rhinoviruses: the cold wars resume. **J Clin Virol**, 42, 297-320.2008.
- Malcolm, E., Arruda, E., Hayden, F. G. & Kaiser, L. Clinical features of patients with acute respiratory illness and rhinovirus in their bronchoalveolar lavages. **J Clin Virol**, 21, 9-16.2001.
- Manoha, C., Espinosa, S., Aho, S. L., Huet, F. & Pothier, P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. **J Clin Virol**, 38, 221-6.2007.
- Marguet, C., Lubrano, M., Gueudin, M., Le Roux, P., Deschildre, A., Forget, C., Couderc, L., Siret, D., Donnou, M. D., Bubenheim, M., Vabret, A. & Freymuth, F. In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. **PLoS One**, 4, e4596.2009.
- Midulla, F., Scagnolari, C., Bonci, E., Pierangeli, A., Antonelli, G., De Angelis, D., Berardi, R. & Moretti, C. Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants. **Arch Dis Child**, 95, 35-41.2010.
- Miller, E. K., Lu, X., Erdman, D. D., Poehling, K. A., Zhu, Y., Griffin, M. R., Hartert, T. V., Anderson, L. J., Weinberg, G. A., Hall, C. B., Iwane, M. K. & Edwards, K. M. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. **J Infect Dis**, 195, 773-81.2007.
- Oliveira, T. F., Freitas, G. R., Ribeiro, L. Z., Yokosawa, J., Siqueira, M. M., Portes, S. A., Silveira, H. L., Calegari, T., Costa, L. F., Mantese, O. C. & Queiroz, D. A. Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clinicas of Uberlandia, MG, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 103, 417-22.2008.
- Palmenberg, A. C., Spiro, D., Kuzmickas, R., Wang, S., Djikeng, A., Rathe, J. A., Fraser-Liggett, C. M. & Liggett, S. B. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. **Science**, 324, 55-9.2009.

- Papadopoulos, N. G., Moustaki, M., Tsolia, M., Bossios, A., Astra, E., Prezerakou, A., Gourgiotis, D. & Kafetzis, D. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. **Am J Respir Crit Care Med**, 165, 1285-9.2002.
- Paranhos-Baccala, G., Komurian-Pradel, F., Richard, N., Vernet, G., Lina, B. & Floret, D. Mixed respiratory virus infections. **J Clin Virol**, 43, 407-10.2008.
- Piralla, A., Rovida, F., Campanini, G., Rognoni, V., Marchi, A., Locatelli, F. & Gerna, G. Clinical severity and molecular typing of human rhinovirus C strains during a fall outbreak affecting hospitalized patients. **J Clin Virol**, 45, 311-7.2009.
- Queiroz, D. A., Durigon, E. L., Botosso, V. F., Ejzenberg, B., Vieira, S. E., Mineo, J. R., Yamashita, C., Hein, N., Lopes, C. L., Cacharo, A. L. & Stewien, K. E. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. **Braz J Med Biol Res**, 35, 1183-93.2002.
- Richard, N., Komurian-Pradel, F., Javouhey, E., Perret, M., Rajoharison, A., Bagnaud, A., Billaud, G., Vernet, G., Lina, B., Floret, D. & Paranhos-Baccala, G. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. **Pediatr Infect Dis J**, 27, 213-7.2008.
- Rossi, G. A., Medici, M. C., Arcangeletti, M. C., Lanari, M., Merolla, R., Paparatti, U. D., Silvestri, M., Pistorio, A. & Chezzi, C. Risk factors for severe RSV-induced lower respiratory tract infection over four consecutive epidemics. **Eur J Pediatr**, 166, 1267-72.2007.
- Semple, M. G., Cowell, A., Dove, W., Greensill, J., McNamara, P. S., Halfhide, C., Shears, P., Smyth, R. L. & Hart, C. A. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. **J Infect Dis**, 191, 382-6.2005.

- Spurrell, J. C., Wiehler, S., Zaheer, R. S., Sanders, S. P. & Proud, D. Human airway epithelial cells produce IP-10 (CXCL10) in vitro and in vivo upon rhinovirus infection. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 289, L85-95.2005.
- Stockton, J., Ellis, J. S., Saville, M., Clewley, J. P. & Zambon, M. C. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. **J Clin Microbiol**, 36, 2990-5.1998.
- Tapparel, C., L'Huillier, A. G., Rougemont, A. L., Beghetti, M., Barazzone-Argiroffo, C. & Kaiser, L. Pneumonia and pericarditis in a child with HRV-C infection: a case report. **J Clin Virol**, 45, 157-60.2009.
- Van der Zalm, M. M., Van Ewijk, B. E., Wilbrink, B., Uiterwaal, C. S. P. M., Wolfs, T. F. W. & Van der Ent, C. K. Respiratory Pathogens in children with and without Respiratory Symptoms. **The Journal of Pediatrics**, 154, 396-400.2009.
- van der Zalm, M. M., van Ewijk, B. E., Wilbrink, B., Uiterwaal, C. S., Wolfs, T. F. & van der Ent, C. K. Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. **J Pediatr**, 154, 396-400, 400 e1.2009.
- World Health Organization, WHO - 1994. International Classification of Diseases, 10th Review, ICD-10. Available from: <http://www.who.int/classifications/icd/en/>.

Anexo I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131
e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 218/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU 387/08

Projeto Pesquisa: Investigação de co-infecção viral em amostras positivas para rinovírus obtidas de crianças com doença do trato respiratório inferior, de janeiro de 2001 a julho de 2009, em Uberlândia – MG.

Pesquisador Responsável: Divina Aparecida Oliveira Queiroz

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.
O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data de entrega do relatório final: fevereiro de 2010.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO

O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 05 de junho de 2009.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Investigação de co-infecção viral em amostras positivas para rinovírus obtidas de crianças com doença do trato respiratório inferior, de janeiro de 2001 a julho de 2009, em Uberlândia, MG

Srs. Pais/Responsáveis,

O seu filho está sendo convidado para participar da pesquisa de vírus respiratórios em espécimes clínicos obtidos de crianças de 0-5 anos de idade com doença respiratória aguda, sob responsabilidade dos professores pesquisadores Dra. Divina A. O. Queiróz e Dr. Hélio Lopes da Silveira e colaboração de Thelma F.M. Oliveira, Lourenço F. Costa, Guilherme R.O. e Freitas, Nayhanne T. de Paula, Bruno Moreira Carneiro, Tatiany Calegari, Poliana C. de Resende e Cecília F Quirino.

Os vírus respiratórios são os principais agentes causadores de doença respiratória aguda em crianças. Sendo assim, a detecção do agente que pode estar causando a infecção em seu filho, além de auxiliar o médico a tratá-lo, irá fornecer informações para trabalhos sobre mecanismos de infecção e sobre a circulação dos principais vírus respiratórios em nossa região. Para isso, precisamos colher aproximadamente 1mL de secreção de nasofaringe, através da instilação de soro fisiológico na narina da criança.

Essa amostra será coletada pelas enfermeiras Tatiany ou Poliana, também responsáveis pela aplicação do T.C.L.E., utilizando equipamento estéril para não haver risco para a criança, e serão processadas no Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o diagnóstico viral, a ser realizado pela equipe acima referida.

O preenchimento da ficha clínica será realizado pelo pediatra mediante informações obtidas dos pais ou responsáveis pela criança e da avaliação clínica. Todos os dados serão confidenciais e os resultados da pesquisa serão publicados sem a identificação do paciente. A participação na pesquisa é voluntária, sem qualquer ônus ou benefício para a criança, podendo ser encerrada a qualquer momento.

Os benefícios serão relativos à descoberta do agente causador da doença, que auxiliará o médico no tratamento e também para a obtenção conhecimento científico.

O paciente pode sofrer relativo desconforto quando da coleta de material clínico (instilação do soro fisiológico nas narinas). Entretanto, todo material utilizado será estéril e procedido por profissionais treinados e capacitados (enfermeiros e médicos).

A qualquer momento os pais e/ou responsáveis pela criança poderão se desligar da pesquisa, sem que haja qualquer tipo de prejuízo ou retaliação para a criança ou responsáveis pela mesma.

Uma cópia deste termo ficara em poder dos pais e/ou responsáveis pela criança.

Em caso de dúvida a respeito da pesquisa, entre em contato com qualquer um dos membros da equipe do Laboratório de Virologia acima referidos.

Instituto de Ciências Biomédicas – Laboratório de Virologia

Endereço: Av. Amazonas, Bloco 4C, andar superior; C.Umuarama; Uberlândia, MG

Fone: (034) 3218-2664

Uberlândia: ____/____/____

Nome do pai/mãe ou responsável

Assinatura

Enfermeira responsável pela coleta

Profa. Dra Divina Aparecida Oliveira Queiróz

Comitê de Ética em Pesquisa da UFU - (34) 3239-4531

ANEXO III

FICHA CLÍNICA – PROJETO VÍRUS RESPIRATÓRIOS

Prontuário: _____

Local atendimento: _____ Data: ____/____/____

Data nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Gênero: M F

Duração da gestação: _____ semanas (definir: pré-termo ou termo) Cor: _____

Aleitamento materno: não sim (duração: _____)

Pais fumantes: não sim Pais atópicos: não sim

Doença de base presente (descrever qual patologia apresenta)

Cardiopatía: não sim

Displasia broncopulmonar: não sim

Imunodeficiência: não sim

Outras (definir): não sim

Descrição do quadro clínico

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| ▪ Início dos sintomas: _____ dias | ▪ Dor de garganta: não sim |
| ▪ Febre: _____ dias | ▪ Dor no corpo: não sim |
| ▪ Coriza: _____ dias | ▪ Mal estar: não sim |
| ▪ Tosse: _____ dias | ▪ Secreção ocular: não sim |
| ▪ Espirros: _____ dias | ▪ Hiperemia ocular: não sim |
| ▪ Outros: _____ | |

Frequência respiratória: _____ irpm

Murmúrio vesicular: _____ Chiados (sibilos): não sim

Retrações torácicas (tiragens): não sim

Apnéia ao atendimento (maior 20 seg com cianose ou bradicardia): não sim

Medicação em uso: _____

Rx de tórax: Hiperinsuflação não sim

Consolidação não sim

Atelectasia não sim

Gasometria arterial: pH= PaCO₂= PaO₂=

HCO₃= SatO₂= BE=

DIAGNÓSTICO NOSOLÓGICO: _____

Admissão: ____/____/____ Local: _____ Ventilação artificial: não sim (_____ dias)