



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde**

ÉRICA VALESSA RAMOS GOMES

**ESTUDO DE INFECÇÕES POR VÍRUS
SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO (VSR)
EM PACIENTES ATENDIDOS EM HOSPITAL
INFANTIL TERCIÁRIO.**

**São José do Rio Preto
2019**

ÉRICA VALESSA RAMOS GOMES

ESTUDO DE INFECÇÕES POR VÍRUS SINCICIAL
RESPIRATÓRIO HUMANO (VSR) EM PACIENTES
ATENDIDOS EM HOSPITAL INFANTIL TERCIÁRIO.

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de São José do Rio Preto
para obtenção do Título de Mestre no
Curso de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, Eixo Temático: Medicina e
Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Aripuaña S. A. Watanabe

São José do Rio Preto, SP
2019

Gomes, Érica Valessa Ramos

Estudo de infecções por vírus sincicial respiratório humano (VSR) em pacientes atendidos em hospital infantil terciário. / Érica Valessa Ramos Gomes

São José do Rio Preto, 2019

52 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Aripuaña S. A. Watanabe

1. Infecções Respiratórias Agudas; 2. Vírus Sincicial Respiratório; 3. População Pediátrica; 4. Bronquite; 5. Hospitalização.

ÉRICA VALESSA RAMOS GOMES

ESTUDO DE INFECÇÕES POR VÍRUS SINCICIAL
RESPIRATÓRIO HUMANO (VSR) EM PACIENTES
ATENDIDOS EM HOSPITAL INFANTIL TERCIÁRIO.

BANCA EXAMINADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE

Presidente e Orientador: _____

2º Examinador: _____

3º Examinador: _____

4º Examinador: _____

5º Examinador: _____

Suplentes: _____

São José do Rio Preto, ___/___/___.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
EPÍGRAFE	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS E QUADROS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	01
2.1. Características do VSR.....	01
2.2. Aspectos epidemiológicos	03
2.2.1. Transmissão viral.....	04
2.2.2. Sazonalidade e população de maior risco	05
2.3. Manifestações clínicas	08
2.3.1 Bronquiolite Viral Aguda (BVA)	10
2.4. Morbidade e mortalidade	12

2.5. Patogenia e imunidade	13
2.6. Coinfecção	15
3. JUSTIFICATIVA	16
4.OBJETIVOS.....	18
4.1. Objetivo geral	18
4.2. Objetivos específicos	19
5. MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1. População do estudo	19
5.2. Coleta de dados	19
5.3. Coleta e processamento de amostras	20
5.4. Extração de ácidos nucleicos	20
5.5. Cepas de vírus controle	21
5.6. Padronização de PCR em tempo real	21
5.7. Análise de subtipos do VSR	23
5.8. Análise da carga viral em amostras detectáveis.....	24
5.9. Análise de resultados	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÃO	37

REFERÊNCIAS39

ANEXO 1.....52

À minha querida e para sempre amiga, Juliana Kindler Figueiredo (in memoriam), que foi um grande exemplo tanto profissional quanto pessoal e cujas conversas me trouxeram lições que eu levarei para toda a vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sentir sempre Sua presença em meu caminho. Seus planos são melhores que os meus.

Agradeço à minha família: mãe, avó e irmão, por todo apoio sem o qual eu não teria base nenhuma para cumprir meus propósitos.

Agradeço aos meus amigos, colegas e professores do Laboratório de Virologia – LPV e Centro de Investigação Microbiológica – CIM, da FAMERP e UNIFESP/EPM que me deram suporte e conhecimento técnico suficientes para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de trabalho e amigos do Instituto Adolfo Lutz pelo apoio e motivação essenciais para que eu trilhasse este caminho acadêmico.

Agradeço ao meu professor orientador, Dr. Aripuaña, por todo o apoio e confiança a mim dispensados e pelo conhecimento compartilhado.

E agradeço ao programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciências da Saúde, da FAMERP, pela oportunidade.

“O homem não é nada além daquilo que a educação faz dele.” –

Immanuel Kant

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Sincício celular formado em decorrência do efeito citopático do VSR.....	02
FIGURA 2. Esquema do genoma viral de RNA de Fita simples único e com sentido de leitura negativo, que codifica 10 proteínas.....	03
FIGURA 3. Distribuição mensal da ocorrência do VRSH na cidade de São José do Rio Preto.....	07
FIGURA 4. Representação esquemática do trato respiratório superior e trato respiratório inferior	09
FIGURA 5. VRSH como maior causador de BVA; seguido de outros vírus como FLU e PIV	12
FIGURA 6. Distribuição de amostras coletadas por mês no período de julho de 2015 a outubro de 2016	29
FIGURA 7. Gráfico representando a porcentagem de amostras positivas e amostras negativas em proporção à população total incluída no estudo.....	30
FIGURA 8. Amostras positivas e negativas coletadas de Julho/2015 a Outubro/2016, encaminhadas ao Laboratório de Virologia.....	33
FIGURA 9. Imagem das curvas da Tm encontradas no PCR da amostra 45 (linha amarela), comparada às curvas dos controles de VSRA e VSRB (linhas verdes)	36

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Relação das coinfeções em amostras de crianças durante um estudo de 2007.....	16
Quadro 1. Primers <i>Foward</i> e <i>Reverse</i> utilizados para amplificação do ácido nucléico do VSR.....	22
Tabela 2. Características gerais da população estudada e informações de histórico pessoal analisados nas fichas clínicas previamente preenchidas.....	27
Quadro 2. Comorbidade e Idade apresentadas pelos pacientes detectáveis para os subtipos do RSV.....	31
Tabela 3. Sintomas apresentados pelos pacientes do estudo, divididos entre positivos e negativos para VSR.....	32
Tabela 4. Análise dos valores de Cts em relação aos Subtipos virais do RSV (A e B) para avaliar a carga viral.....	35
Tabela 5. Análise das Cts de Subtipos virais em relação à idade.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

VSRH – Vírus Sincicial Respiratório Humano

VSR / RSV – Vírus Sincicial Respiratório / *Respiratory Syncytial Virus*

ITRI – Infecção do Trato Respiratório Inferior

HCM – Hospital da Criança e Maternidade

IRA – Infecção Respiratória Aguda

OMS – Organização Mundial de Saúde

BVA – Bronquiolite Viral Aguda

ADV – Adenovírus

RiV – Rinovírus

PIV 1,2 e 3 – Parainfluenza 1, 2 e 3

FLU – Vírus Influenza

hMPV – Metapneumovírus humano

IgG1 – Imunoglobulina G

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

RNA – *Ribonucleic Acid* / Ácido Ribonucléico

DNA – *Desoxirribonucleic Acid* / Ácido Desoxirribonucléico

RT-PCR - Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase.

DTT – Ditioneitol, pequena molécula redutora $C_4H_{10}O_2S_2$

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados, fornecem energia e nucleotídeos necessários para produzir cópias das sequências alvo do DNA.

MMLV – Enzima do Vírus da Leucemia Murina (*Moloney Murine Leukemia Virus*) usada em reações de retrotranscrição *in vitro*.

RESUMO

Introdução: Segundo a Organização Mundial de Saúde, a infecção aguda do trato respiratório inferior é a quarta maior causa de morte no mundo. O Vírus Sincicial Respiratório humano (VSR) é reconhecido como a causa mais importante de infecção do trato respiratório inferior (ITRI) em crianças. Até dois terços das doenças pulmonares mais graves em lactentes no Brasil são causados pelo VSR. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência do VSR, seus subtipos (VSR A e VSR B) e carga viral apresentada em pacientes atendidos no serviço pediátrico do Hospital da Criança e Maternidade (HCM), referência em atendimentos pediátricos em São José do Rio Preto, SP, durante o período de Julho/2015 a Outubro/2016, além de avaliar seus aspectos clínicos através de uma ficha direcionada a esta investigação. Todo o estudo foi realizado mediante a aprovação do comitê de ética. **Material e Métodos:** Foram analisadas amostras de *swab* respiratório de crianças entre zero a quatro anos de idade, hospitalizadas por apresentarem quadro de infecção respiratória aguda (IRA). Também foram preenchidos, pelos responsáveis pelas crianças, uma ficha de informações clínicas dos pacientes e o termo de consentimento para participação no estudo. As amostras foram submetidas ao exame molecular específico para detecção de VSR por meio de protocolo de PCR *real time*. **Resultados:** No total, 86 amostras foram coletadas, das quais 47 (55%) apresentaram positividade para o agente investigado. Destas, 27 foram isolados de pacientes do gênero feminino e 19 do gênero masculino. Um paciente não teve seu gênero registrado na ficha clínica. O VSR B foi o subtipo que mais atingiu a população

estudada (N= 81) em ambos os gêneros, porém o VSR A foi o subtipo que apresentou a maior carga viral entre as amostras investigadas. Crianças menores de seis meses de idade apresentaram maior positividade global e diferença estatística importante ($p < 0,05$). Os sintomas clínicos com diferença estatística significativa, investigados através dos questionários clínicos foram coriza, tosse e chiado e estão de acordo com os relatos já descritos como presentes na bronquiolite por VSR. **Conclusões:** Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a importância de se identificar a ocorrência do VSR em populações de risco auxiliando na construção de medidas de controle e prevenção mais eficazes contra estas infecções.

Palavras Chave: Infecções Respiratórias Agudas; Vírus Sincicial Respiratório; População Pediátrica; Bronquillite; Hospitalização.

ABSTRACT

Introduction: According to the World Health Organization, the acute lower respiratory tract infection is the fourth leading cause of death worldwide. Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is recognized as the most important cause of Lower Respiratory Tract Infection (LRTI) in children. Up to two thirds of the most serious pulmonary diseases in infants in Brazil are caused by HRSV.

Objective: The present study aimed to investigate the occurrence of HRSV and its subtypes (HRSV A and HRSV B) in patients that have been attended in the pediatric service of the Hospital of Children's Hospital and Maternity, HCM, a reference in pediatric care in São José do Rio Preto, SP, during the period from July / 2015 to October / 2016. **Material and Methods:** Respiratory swab samples have been collected from children between zero and four years of age, that were hospitalized for acute respiratory infection (ARI). The clinical symptoms were investigated through a clinical questionnaire filled out by each of their responsables, along with the consent term. The samples have been submitted to specific molecular tests for detection of HRSV by means of a real time PCR protocol previously described in the literature. **Results:** A total of 86 samples were collected, out of them, 47 (55%) presented positivity for the investigated agent. Out of these, 27 female patients and 19 males. One patient did not have his gender reported. HRSV B was the subtype that most affected on the studied population, both genders, but HRSV A was the subtype that presented the highest viral load among the samples investigated. Children younger than six months of age have presented greater global positivity and significant statistical difference ($p < 0.05$). The clinical symptoms with significant

statistical difference were as follow: coryza, cough and wheezing. They were in accordance with the reports already described as characteristic of HRSV bronchiolitis. **Conclusions:** The results obtained in the present study reinforce the importance of identifying the occurrence of HRSV in populations at risk, providing more effective control as well as the prevention of measures against these infections.

Keywords: Acute respiratory infection; Human Respiratory Syncytial Virus; pediatric population; bronchiolitis; hospitalization.

1. INTRODUÇÃO

No ano de 1961, Adams *et al.* notaram um surto de infecção respiratória em crianças, as quais apresentavam, em suas amostras, características como formação de sincícios resultantes da fusão de células infectadas e diagnosticaram então, nestes pacientes, infecção pelo o recém-descoberto Vírus Sincicial Respiratório Humano (VSRH)⁽¹⁾.

Este agente foi isolado anteriormente, em 1956, por Morris *et al.* em secreção de primata (chimpanzé) que apresentava sintomatologia caracterizada por tosse, espirros e secreção nasal purulenta e por tal, foi denominado agente da coriza do chimpanzé. Posteriormente, Chanock *et al.* demonstraram semelhanças entre o vírus isolado em chimpanzés e outro, isolado em crianças com quadro de pneumonia e laringotraqueobronquite, descrevendo a característica histopatológica semelhante entre os dois agentes, os sincícios celulares, além de descreverem a apresentação clássica da doença: tosse, coriza, chiado ^(2,3).

O vírus sincicial respiratório causa, frequentemente, infecções no trato respiratório inferior de indivíduos que apresentam o sistema imune imaturo, suscetível ou fragilizado, principalmente recém nascidos, crianças e idosos⁽⁴⁾.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do VSR

A família *Paramyxoviridae* engloba as seguintes subfamílias: *Paramyxovirinae* e *Pneumovirinae*. O VSRH pertence ao gênero *Pneumovirus*, dentro da subfamília *Pneumovirinae*. Diferente dos outros paramixovírus, o VSR não apresenta atividades de hemaglutinina e neuraminidase, e reinfecções ocorrem várias vezes durante a vida até mesmo em idosos⁽⁵⁾.

Os vírus da família *Paramyxoviridae* são pleomórficos (não possuem forma definida) de tamanhos variáveis; as partículas virais são por sua vez compostas por um nucleocapsídeo e um envelope, constituído por uma bicamada lipídica que é derivada da célula do hospedeiro⁽⁶⁾. Estudos *in vitro* demonstraram que esse agente é capaz de induzir a formação de células gigantes sinciciais e, devido a sua afinidade pelo trato respiratório, foi denominado Vírus Sincicial Respiratório⁽⁷⁾.

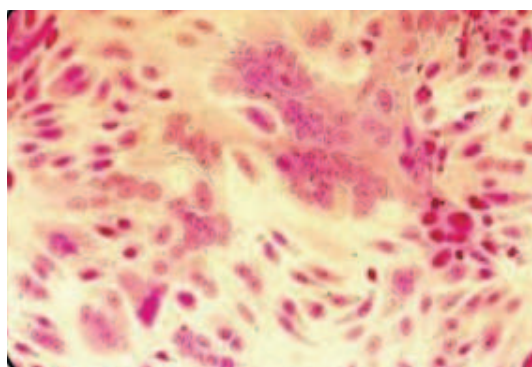


Figura 1 – Sincício celular formado em decorrência do efeito citopático do VSR.⁽⁸⁾

O vírus apresenta um genoma viral de aproximadamente 15.000 nucleotídeos na forma de RNA fita simples de polaridade negativa^(5,6). O Genoma do VSR (figura 2) codifica aproximadamente 10 proteínas, sendo duas não estruturais (NS). Em sua face interna temos a nucleoproteína (N), a fosfoproteína

(F) e a polimerase viral (L), sendo as duas primeiras as regiões mais conservadas do genoma. No envelope temos a glicoproteína SH – proteína hidrofóbica pequena ou *small hydrofobic*; glicoproteína G – proteína de ligação do receptor e a glicoproteína F – proteína de fusão. A glicoproteína M ou proteína de matriz é uma proteína que se localiza na parte interna do envelope viral e a M2 está relacionada com a replicação do RNA viral^(9,10).

Os VSR são divididos em dois grupos antigênicos, A e B, baseados em reações com anticorpos monoclonais contra a glicoproteína G e, posteriores, análises do genoma viral. O grupo VSR A apresenta 12 genótipos (GA1 – GA7, SAA1, NA1, NA2, ON1 e ON2) e o VSR B apresenta 24 genótipos (BA1-BA12, GB1-GB5 e SAB1–SAB4, URU1-URU2 e THB)⁽¹¹⁾.

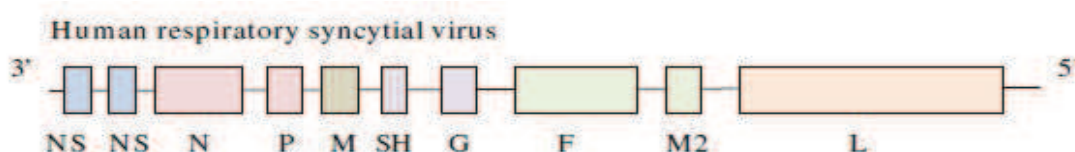


Figura 2 – Esquema do genoma viral de RNA de fita simples único e com sentido de leitura negativo, que codifica 10 proteínas⁽⁹⁾.

2.2 Aspectos Epidemiológicos

As infecções agudas do trato respiratório inferior são a quarta maior causa de morte no mundo⁽¹²⁾. Essas síndromes respiratórias, quando causadas por vírus, variam desde resfriados comuns até pneumonias fulminantes. Vírus até então considerados como causadores de resfriados comuns, têm sido

recentemente associados a quadros de pneumonias em crianças, com a necessidade de hospitalização⁽¹³⁾. O VSR é reconhecido como a causa mais importante de Infecções do trato respiratório inferior (ITRI) em crianças^(12,13,14,15).

A população pediátrica é particularmente vulnerável às infecções respiratórias de etiologia viral e com o aprofundamento da investigação das síndromes respiratórias infecciosas, demonstra-se cada vez mais que alguns vírus, em especial o já bem conhecido vírus sincicial respiratório, são responsáveis por quadros de variada intensidade⁽¹⁴⁾. Segundo um estudo de coorte realizado por Arruda *et al.*, até dois terços das doenças pulmonares mais graves em lactentes, no Brasil, são causadas por VSR⁽¹⁵⁾.

2.2.1 Transmissão viral

O VSRH é transmitido principalmente pelo contato direto com secreções respiratórias contaminadas ou inalação de gotículas derivadas de tosse ou espirro. Apresenta alta virulência e patogenicidade quando localizado em mucosas nasais e orais, qualquer que seja a fonte de infecção. O vírus permanece viável em roupas, aventais, pijamas e lenços de papel por volta de 45 minutos; sobre superfícies planas e não porosas, como grades de berço e estetoscópios, por aproximadamente 6 horas; luvas cirúrgicas cerca de 90 minutos e nas mãos, por menos de 1 hora⁽¹⁶⁾.

Medidas de controle nos hospitais devem ser tomadas para evitar a disseminação desse vírus em crianças internadas, uma vez que mais de 45% dos contatos adquirem esse tipo de infecção. As recomendações são para

isolamento do paciente acometido em quarto separado individual ou em conjunto com outras crianças infectadas, para assim diminuir a transmissão do vírus e inclui, também, técnicas de barreira (luvas, máscaras, aventais), seleção e separação de enfermeiras e restrição às visitas. Medidas como lavagem das mãos, são de fundamental importância na diminuição do contágio tanto em ambientes pediátricos, quanto em locais fechados como creches e escolas⁽⁷⁾.

O VSR é altamente contagioso, com período de incubação que pode variar de quatro a cinco dias. A entrada do vírus em uma Unidade de Cuidado Intensivo em Pediatria pode ser altamente devastadora. O trato respiratório inferior é afetado em aproximadamente 25% a 33% dos casos; e aproximadamente 1% dessas crianças evoluem para um estado grave. A cada ano, aproximadamente 95.000 crianças são internadas nos Estados Unidos com essa virose. As epidemias causadas por este vírus ocorrem todos os anos em diversos lugares do mundo, com taxas anuais globais em torno de 64 milhões de infectados e cerca de 160.000 mortos^(5, 7).

2.2.2 Sazonalidade e Populações de Maior Risco

As infecções causadas pelo VSR tem distribuição universal. O vírus segue um padrão sazonal bem característico. Em regiões tropicais, o VSR se comporta de maneira distinta, tendo maior prevalência em meses mais frios do ano que vão do outono ao começo da primavera e apresentando maior prevalência no inverno, onde a umidade relativa do ar pode variar de 45-65% ou menos⁽⁷⁾. Ambas as linhagens de VSR, A e B, podem circular durante um mesmo período

epidêmico, mas, em geral, os episódios atribuídos a cada cepa variam de um ano para outro, e também de um local para outro⁽⁷⁾.

No Brasil, embora não haja vigilância epidemiológica oficial para o VSR, estudos em diversas regiões do país e os dados de hospitalização por bronquiolite, a principal manifestação clínica da doença, nos indica que a carga da doença entre nós assemelha-se aos relatos mundiais^(17,18). A sazonalidade varia de região para região. No sul, o pico do VSR ocorre mais tardiamente entre abril e até setembro, concomitante com a estação do vírus *influenza*. Na região norte, o VSR circula especialmente no primeiro semestre, no período de chuva intensa na região, com pico de ocorrência no mês de abril. No sudeste, nordeste e centro oeste, predomina a circulação de março a julho⁽¹⁶⁾.

Outros dois importantes fatores a considerar são: a relação estreita, cada vez mais demonstrada, entre infecção precoce grave por VSR e sibilância recorrente⁽¹⁸⁾, e o crescente aumento em todo o mundo do número de hospitalizações por bronquiolite. Nos EUA, nos últimos 20 anos, houve uma duplicação nas taxas de hospitalização de lactentes por infecção pelo VSR. No Reino Unido essas taxas triplicaram nos últimos 25 anos. Em São Paulo observou-se um aumento de 70% nas últimas duas décadas^(17,18,19).

Em estudos distintos realizados por Bonfim *et al.*⁽²⁰⁾, o VSR foi detectado em aproximadamente 5,8% dos casos estudados (782 amostras, em 2 anos). Infecções graves ocorrem em crianças com doenças cardíacas congênitas e imunodeprimidos, apresentando, nestes casos, uma mortalidade severa⁽²¹⁾.

Em estudos realizados por Salomão Junior *et al.* (2011) – figura 3 - o VSR foi detectado em aproximadamente 29,3% dos casos estudados de crianças

internadas por infecção aguda das vias aéreas inferiores (290 amostras, em dois anos). Este estudo realizado na cidade de São José do Rio Preto entre os anos de 2004 e 2005, mostrou alguns dados sobre a distribuição das internações causadas pelo VSR entre os meses do ano da pesquisa, comparativamente ao total de internações por infecções das vias aéreas⁽²²⁾.

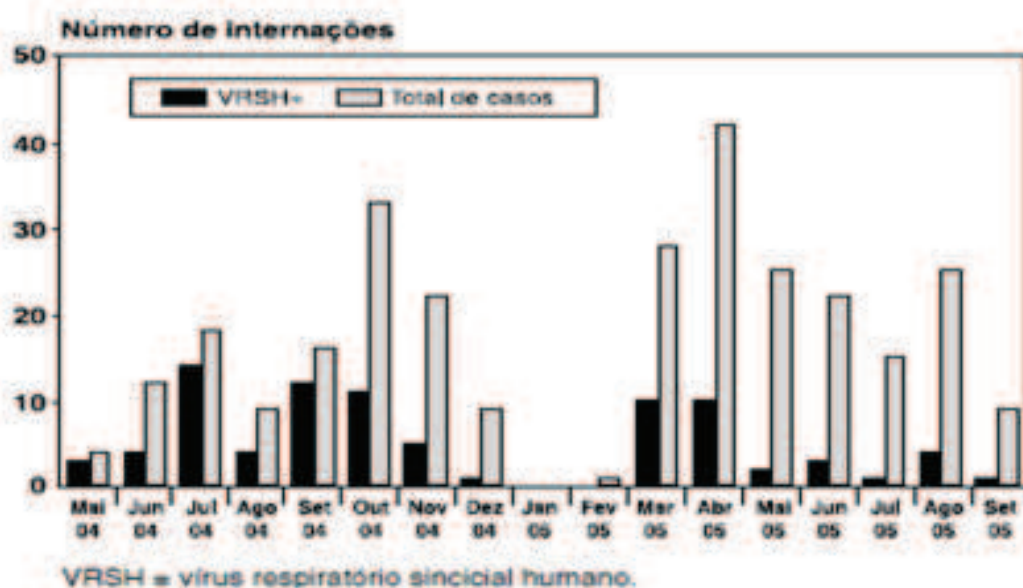


Figura 3 – Distribuição mensal da ocorrência do VSRH na cidade de São José do Rio Preto⁽²²⁾.

Todas as crianças com até três anos de idade já foram em algum momento infectadas pelo VSR, sendo que cerca de 60-70% foram infectadas até o final do primeiro ano de vida. Sabe-se também que as infecções pelo VSR podem ocorrer inúmeras vezes durante toda a vida das pessoas⁽²³⁾.

A infecção pelo VSR em crianças mais velhas pode ser um quadro mais atenuado. Já em crianças de menor idade, com o sistema imune imaturo e junto a outros fatores, pode levar o paciente à internação em Unidades de Terapia

Intensiva ou até mesmo ao óbito, se não for tratado corretamente⁽²⁴⁾. O VSR pode ser detectado em cerca de 40% dos lactentes com idade inferior a seis meses de vida e podem acarretar um quadro clínico com bronquiolite e pneumonia⁽²⁴⁾.

O VRSB acomete sim adultos saudáveis, porém nestes a infecção se resolve em uma semana aproximadamente e não apresenta evolução do quadro, sendo o vírus eliminado sem complicações ou seqüelas da infecção^(9,21).

Outros fatores associados ao risco aumentado de doença grave em indivíduos infectados são a doença pulmonar crônica, cardiopatia congênita, prematuridade, imunodepressão ou pacientes que estejam institucionalizados⁽²⁵⁾.

No ano de 2011, segundo o Instituto Adolfo Lutz, ocorreu um predomínio do VSR no Estado de São Paulo, em cerca de 54% das amostras respiratórias coletadas⁽²⁶⁾. Segundo Boletim Epidemiológico, no ano de 2013 houve um aparecimento do VSR na América Central e Caribe. No Brasil, no mesmo ano, o VSR teve prevalência no início do ano e nos meses de março a abril⁽²⁷⁾. Já em 2014, a detecção do VSR se estendeu até fim de agosto⁽²⁸⁾.

Nos anos de 2015 e 2016, o VSR circulou desde o primeiro trimestre e manteve sua sazonalidade mesmo com o aumento dos casos de influenza A H3N2 em 2015 e de influenza A H1N1 em 2016^(29,30).

2.3 Manifestações Clínicas

O VSR pode causar vários espectros de doenças no trato respiratório (figura 4), passando por uma gripe comum leve em adultos até um quadro clínico mais grave como pneumonia e bronquiolite em recém-nascidos^(5, 24).

Devido à inflamação nos bronquíolos, ocorre um bloqueio de ar e uma menor ventilação. Clinicamente o paciente pode apresentar um quadro geral com febre baixa, tosse, taquipnéia (aceleração do ritmo respiratório), dificuldade na respiração, taquicardia (aceleração dos batimentos cardíacos), e sibilância (chiado) ao respirar. Eventualmente a bronquiolite é autolimitada, ou seja, tende a melhorar em alguns dias ou semanas; porém pode ser preocupante quando observada em bebês. Ela pode ser fatal em prematuros, pacientes com doenças pulmonares e imunocomprometidos^(5,31).

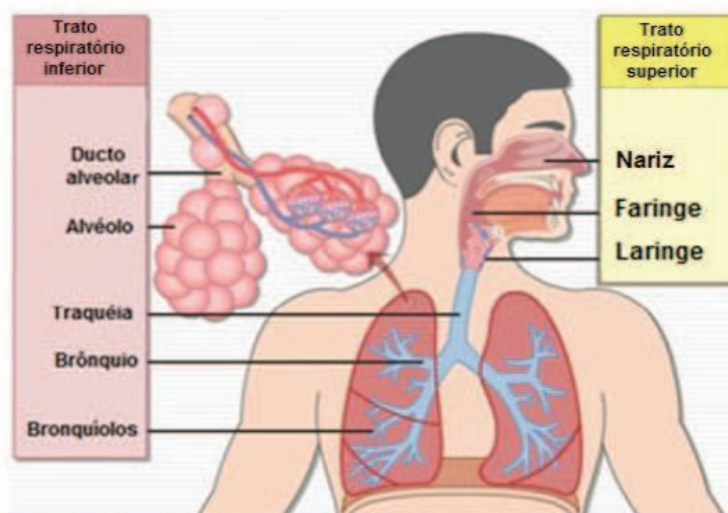


Figura 4 – Representação esquemática do trato respiratório superior e trato respiratório inferior.

Fonte: <http://iaqk.org.uk/Resourcesrespitatpry.html>(Adaptado)

A infecção do trato respiratório superior leva a rinorréia (nariz escorrendo) e é muito comum em crianças e adultos. As doenças mais graves no ducto respiratório inferior levam a bronquiolite, na sua maioria em bebês, onde cerca de 1% dessa população desenvolve uma forma mais grave da doença podendo ocasionar a internação destes pacientes^(5, 24).

Crianças que foram contaminadas pelo VSR e mostraram um quadro clínico de bronquiolite e pneumonia podem, posteriormente, se recuperar quase que completamente. Porém, em alguns pacientes, a função pulmonar pode se mostrar anormal por anos após sua infecção. É possível que pacientes mais susceptíveis ao VSR, desenvolvam uma forma mais crítica da doença devido a inúmeros fatores. Cerca de um terço das crianças infectadas adquirem infecção no ouvido⁽²⁴⁾.

2.3.1 Bronquiolite Viral Aguda (BVA)

A bronquiolite, segundo Silveira, tem como definição⁽³²⁾:

Bronquiolite viral aguda (BVA) é definida como uma síndrome respiratória causada pelo VSR, onde ocorre presença de sibilância (chiado), taquidispnéia (aumento do fluxo respiratório), retrações intercostais em crianças menores de dois anos de idade (lactantes); onde é visível por meio de Raio-X hiperinsuflação pulmonar (onde não

ocorre total saída de ar dos pulmões) e infiltrados nos pulmões. Saturação de Oxigênio (SO_2) é menor que 90%.

A BVA é a principal síndrome clínica causada pelo VRS, sendo este o principal agente etiológico dessa doença e causando inúmeras internações de crianças menores de dois anos de idade ao redor de todo o mundo. Até o momento não foi definido o mecanismo pelo qual o VSR causa a BVA nesses pacientes, contudo ainda se pesquisa porque alguns pacientes pediátricos entram em óbito e outros se apresentam assintomáticos. Estudos mostram que, além do fator imune deficiente, fatores genéticos e ambientais estão envolvidos nesse mecanismo⁽³³⁾. Nos EUA ocorrem cerca de 4.000 mortes por ano devido a BVA grave. No Brasil essa taxa varia de 41,7% a 83,6% do total de casos de BVA sendo a maior parte dos casos em crianças menores de cinco anos de idade. Em países mais desenvolvidos essas taxas são mais baixas em comparação ao Brasil^(34, 35).

Crianças prematuras correm maior risco de desenvolverem BVA pelo fato de seus pulmões ainda não estarem completamente desenvolvidos, possuírem ou não doenças pulmonares crônicas e doenças cardíacas congênitas. Esse risco pode ser sete vezes maior se comparado aquelas crianças que têm os pulmões bem desenvolvidos e não possuem doenças cardíacas^(34, 35).

A ventilação mecânica pode ser necessária como suporte no tratamento para essa doença, que se apresenta junto aos seguintes sintomas: rinorréia, tosse e febre acompanhado de coriza podendo, com a evolução do quadro, levar a taquipnéia e dificuldades para respirar (respiração acelerada)^(34, 35).

Um estudo realizado no Sul do Brasil, no ano de 2011, mostra que o principal causador de BVA é o VSR (figura 5). Outros vírus como ADV, RiV, PIV 1,2 e 3, FLU e hMPV também colaboram na causa dessa síndrome clínica⁽³⁶⁾.

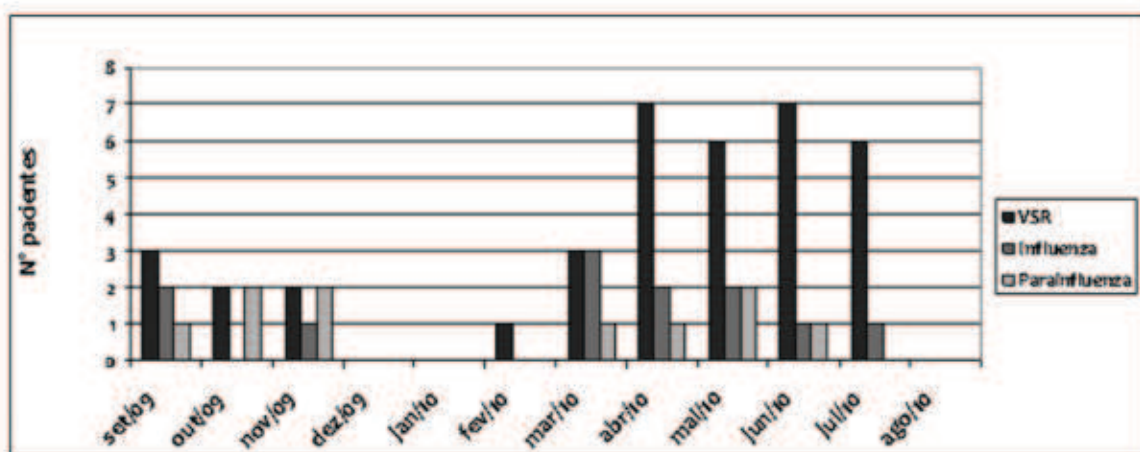


Figura 5 – VRSH como maior causador de BVA; seguido de outros vírus como FLU e PIV⁽³⁶⁾.

2.4 Morbidade e Mortalidade

O vírus respiratório sincicial humano é uma grande ameaça à saúde de crianças. Sendo considerado a principal causa de ITRI em crianças pequenas de países em desenvolvimento e desenvolvidos; com cerca de aproximadamente 34 milhões de novas ocorrências por ano em todo o mundo^(20,37).

Tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, doenças respiratórias contribuem para uma grande taxa de morbidade e

mortalidade; sendo responsável por 25 a 33% do total de mortes em crianças menores de cinco anos de idade⁽³⁸⁾.

Uma grande preocupação com os vírus respiratórios vem ganhando destaque quando dados da comunidade científica passaram a associar estes agentes infecciosos com a exacerbação da asma, identificando o rinovírus humano como principal responsável pelo desequilíbrio na homeostase imunológica do sistema respiratório, seguido pelo VSR e, consecutivamente, pelo adenovírus, vírus Influenza, entre outros⁽³⁹⁾.

Deve-se ter uma maior atenção à saúde de grupos prioritários como crianças, idosos e pessoas com sistema imune comprometido, para que futuramente possam se desenvolver e consolidar estratégias de combate à mortalidade e morbidade e promover uma melhor qualidade de vida para estes pacientes. Ações e boas práticas como uma simples lavagem das mãos devem ser adotadas para que as infecções por este tipo de vírus diminuam. Essas ações devem ser colocadas em prática no dia-a-dia⁽⁴⁰⁾.

As estatísticas mundiais mais recentes da OMS registram que 15mil crianças ainda morrem, por dia, devido a causas evitáveis, e as infecções do trato respiratório inferior fazem parte destas causas. A organização publicou, em 2018, um documento propondo metas aos seus países membros com o intuito de reduzir a mortalidade neonatal e de crianças menores de cinco anos até 2030⁽⁴¹⁾.

2.5 Patogenia e Imunidade

Segundo MURRAY et al.⁽⁵⁾, o VSR produz uma infecção localizada no trato respiratório inferior. Como o próprio nome diz, o VSR induz formação de sincício; um efeito patológico da invasão direta do VSR no epitélio respiratório inferior. Em seguida ocorre lesão celular imunomediada. A necrose dos brônquios e bronquíolos leva à formação de muco, material necrosado e fibrina dentro dos ductos de entrada de ar nos pulmões. Em bebês esses ductos são rapidamente obstruídos por esse tipo de secreção acumulada. A imunidade natural (resposta imunológica inata) não evita a infecção por esse vírus e a vacina com vírus inativado pode exacerbar a gravidade da doença levando o paciente, sendo ele criança ou idoso, à morte⁽⁵⁾.

Não existe tratamento específico a esta infecção, e os pacientes comprometidos de maneira mais severa são internados e recebem tratamento de suporte, como hidratação, oxigenação e fisioterapia respiratória, apresentado com isso boa evolução. São de extrema importância, o emprego de medidas de controle de surtos na comunidade e em ambientes hospitalares⁽¹⁶⁾.

A melhor medida profilática atualmente existente é o palivizumab, um anticorpo monoclonal, IgG1 humanizado, direcionado ao epítipo antigênico da proteína A, que promove a fusão do vírus na célula hospedeira. É administrado em pacientes considerados vulneráveis à infecção por VSR, uma vez ao mês, por no máximo cinco doses. A imunização passiva é distribuída pelo Ministério da Saúde no período de sazonalidade do vírus⁽¹⁶⁾.

Estudos de vacinas contra o VSR tem sido realizadas sem, contudo, ainda apresentar sucesso. O projeto mais recente, que se mostra promissor, tem investigado a imunogenicidade de uma subunidade da proteína F, VRC-

RSVRGP084-00-VP (DS-Cav1), de forma isolada e com adjuvantes. A conclusão do estudo está prevista para o ano de 2020⁽⁴²⁾.

2.6. Coinfecção

Sendo o VSR o causador mais frequente das internações em crianças menores de um ano de vida, como já citado, a sua investigação é importante nesse período de vida⁽⁴³⁾.

Com a descoberta de técnicas de diagnóstico mais sensíveis como a qPCR, descobriu-se que bactérias e vírus levam a um aumento significativo nos casos de pneumonia e vários casos de coinfecção do trato respiratório são causados por esses agentes etiológicos⁽⁴⁴⁾.

Vários vírus são expressivos agentes etiológicos causando infecções juntamente com o VSR. As coinfecções virais ganharam uma maior visibilidade logo após a introdução de métodos de biologia molecular como a PCR no diagnóstico destes agentes^(20,43,45). Metapneumovírus humano (hPMV); Adenovírus (ADV); Parainfluenza (PIV)1, 2 e 3; Influenza (FLU) A e B; Rinovírus (RiV); Bocavírus e Coronavírus aparecem junto com o VSR em amostras de crianças investigadas (Tabela 1)⁽⁴⁶⁾.

Tabela 1: Relação das coinfeções em amostras de crianças durante um estudo de 2007⁽⁴⁶⁾.

	VRSH	MPVH	VPIH3	Adenovírus	Infl A	VPIH1	TOTAL
VRSH	68	05	02	02	03	01	81
MPVH	05	49	01	04	01	-	60
VPIH3	02	01	20	04	01	-	28
Adenovírus	02	04	04	13	-	-	23
Influenza A	03	01	01	-	12	-	17
VPIH1	01	-	-	-	-	01	02

* Número de amostras contendo cada conjunto de vírus (linha x coluna). Infecções simples em negrito. Infl A = vírus influenza A; MPVH = metapneumovírus humano; VPIH1 = parainfluenza humana I; VPIH3 = parainfluenza humana III; VRSH = vírus respiratório sincicial humano.

Bonfim *et al.*, em um estudo na cidade de São José do Rio Preto, também mostra esses patógenos virais como sendo os responsáveis das IRA em crianças pequenas; pois as mesmas podem ser mais suscetíveis devido a características fisiológicas, imunológicas e anatômicas⁽²⁰⁾. Porém, a ocorrência do VSR não fica restrita apenas às crianças. Idosos, com uma imunidade mais baixa ou comprometida em comparação com adultos saudáveis, estão mais suscetíveis a estas viroses respiratórias⁽⁸⁾.

Poucos estudos relatam coinfeção de ambos os subtipos virais, VSRA e VSRB, porém sabe-se por achados na literatura que, apesar de pouco conhecidas e sem muitos esclarecimentos sobre possíveis complicações clínicas, este tipo de infecção ocorre^(47,48).

3. JUSTIFICATIVA

Infecções respiratórias virais estão entre as doenças que apresentam maior morbidade e mortalidade em todo o mundo, principalmente na infância⁽⁴⁹⁾.

Estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde em 2004⁽⁵⁰⁾ descreve que as infecções respiratórias virais são a terceira causa de morte independente da idade, com aproximadamente 4,2 milhões de mortes a cada ano. Nos países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, essa doença causa aproximadamente 900 mil mortes a cada ano. Além de tudo, são a principal causa de atendimento médico no mundo, causando assim grande impacto econômico no sistema de saúde⁽⁵¹⁾. No Brasil, em 2013 as doenças respiratórias virais responderam por 11,4% das mortes no país, e 12,5% dos óbitos na região sudeste⁽⁵²⁾.

Em crianças até cinco anos de idade, as Infecções Respiratórias Agudas de origem viral possuem um impacto mais significativo; das 10,4 milhões de mortes anuais, 17% (1,8 milhões) são causadas por vírus, anualmente⁽⁵⁰⁾. A epidemiologia do VSR como causador desta infecção em crianças já é bem estabelecida^(53, 54), porém a sua sazonalidade ainda permanece pouco estudada em algumas regiões. A massificação da utilização dos métodos moleculares, principalmente na área de pesquisa científica, proporcionou novos conhecimentos à respeito da ocorrência e epidemiologia dos vírus respiratórios, criando uma nova área denominada epidemiologia molecular. A PCR em tempo real, mais sensível quando comparada à PCR convencional, tem aberto novos horizontes para a detecção laboratorial dos agentes virais em geral⁽⁵⁵⁾.

É importante considerar nesse caso que desde a pandemia de 2009, foi estabelecida uma forte rede de vigilância sobre os vírus influenza no país e no mundo. Dados regionais são gerados semanalmente pela vigilância

epidemiológica do estado de São Paulo junto ao Instituto Adolfo Lutz, tanto para a síndrome gripal quanto para síndrome respiratória aguda grave⁽⁵⁶⁾.

O desenho do presente estudo pode fornecer dados iniciais para um melhor entendimento da infecção por VSR já que a rede de vigilância sobre a epidemiologia molecular do VSR não está reforçada e, recentemente, passou a existir um atendimento mais especializado em agravos infantis pela abertura do Hospital de Criança e Maternidade junto ao Hospital de Base de São José do Rio Preto e FUNFARME.

Estudos nacionais em sua maioria são do tipo transversal e dificilmente avaliam a evolução dos pacientes infantis com doença respiratória viral. Somado a esse fato, dados sobre pacientes hospitalizados e ambulatoriais podem demonstrar o possível papel do VSR em infecções graves, bem como qual tipo afeta mais a população local.

Como um resultado adicional do presente estudo pode também ocorrer o início da instalação de uma rotina para detecção molecular de VSR para o hospital pediátrico, auxiliando assim o corpo clínico com medidas de prevenção e controle de possíveis surtos, bem como, auxiliar o manejo clínico dos pacientes infectados.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Estudar casos de infecções por VSRH em população pediátrica atendida em hospital terciário da região sudeste do Brasil.

4.2 Objetivos específicos

I - Determinar a ocorrência de infecção respiratória aguda causada pelo Vírus Sincicial Respiratório em crianças de zero a 12 anos hospitalizadas.

II – Verificar o tipo de VSRH que predominou na população estudada.

III - Estudar os aspectos clínicos da doença respiratória aguda por VSR e verificar se estes, junto aos dados laboratoriais encontrados no estudo, corroboram com os já descritos na literatura.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 População do estudo

A população estudada constituiu-se de crianças com idade de zero a 12 anos, com quadro clínico de infecção respiratória aguda. As amostras e dados foram coletadas durante os anos de 2015 a 2016, após convite de participação voluntária no projeto aos responsáveis pelas crianças e prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FAMERP.

5.2 Coleta de dados

Após os devidos esclarecimentos aos pais ou responsáveis pelo menor e assinatura do termo de consentimento informado, foi realizado preenchimento da ficha com os dados clínicos (Anexo 1). Esta ficha investigou dados sobre tempo de início de sintomas até o momento da coleta, sintomas respiratórios (tosse, coriza, dor de garganta e dispnéia) e sintomas gerais (febre, cefaléia, mialgia e calafrio). Também foram coletados dados sobre vacinação prévia contra o vírus influenza. O colaborador do estudo responsável pela coleta destes dados e amostras foi uma aluna e funcionária do quadro de enfermagem do HCM e, enquanto os pais e responsáveis, após autorizarem a participação no estudo e assinarem o termo de consentimento, preencheram a ficha clínica a profissional realizava a coleta do material.

5.3 Coleta e processamento das amostras

Foram coletadas amostras de swab nasal e swab de nasofaringe. Todas as coletas foram realizadas por profissional especializado e treinado.

Uma vez coletada, a amostra foi encaminhada imediatamente para o laboratório, alíquotada e congelada a -80°C para posterior processamento por método molecular qPCR.

5.4 Extração de ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos foram extraídos diretamente das alíquotas separadas anteriormente (mantidas a -80°C) para o qPCR utilizando-se Kits para extração

de RNA - “*QIAamp Viral RNA extraction Kit*” (Qiagen, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, o material foi estocado em freezer -80°C até o momento de sua aplicação na PCR em tempo real.

5.5 Cepas de vírus controle

As cepas do VSR A e B usadas como controles positivos das reações, foram previamente sequenciadas para definição dos subtipos e gentilmente cedidas pela pesquisadora Nancy Bellei, da disciplina de infectologia, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP/EPM.

5.6 Padronização de PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real para o vírus estudado foi realizada com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores⁽⁵⁷⁾ descritos no quadro 1.

Quadro 1. Primers *Foward* e *Reverse* utilizados para amplificação do ácido nucléico do VSR⁽⁵⁷⁾.

Primers do VSR	Sequência (5'-3')	Gene alvo	Referência
RSVAF	GCTCTTAGCAAAGTCAAGTTGAATGA	N	Hu (2003)
RSVAR	TGCTCCGTTGGATGGTGTATT	N	Hu (2003)
RSVBF	GATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTTAA	N	Hu (2003)
RSVBR	TGTCAATATTATCTCCTGTACTACGTTGAA	N	Hu (2003)

A primeira reação molecular realizada foi uma retrotranscrição ou reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) do material extraído para gerar cópias de DNA que suportariam a ciclagem em alta temperatura da reação de PCR em tempo real - qPCR. Para isso foi realizado um protocolo que incluiu oligonucleotídeos randômicos que amplificaram grande parte das sequências presentes no produto de extração; reagente previamente preparado contendo DTT e dNTPs; tampão e enzima MMLV (enzima transcriptase reversa), em ciclagem de 37°C por 60 minutos e 70°C por 15

segundos. Ao final da reação de RT-PCR as amostras foram estabilizadas a 4°C até serem refrigeradas em freezer -80°C para posterior realização do qPCR.

A técnica para detecção específica do vírus estudado foi realizada seguindo-se o protocolo preconizado para o Kit comercial GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega, EUA), baseado na fluorescência do corante SYBR GREEN, corrida no aparelho " StepOnePlus™ Real-Time PCR System" (Applied Biosystems, EUA). Os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* usados nesta etapa são os mesmos descritos anteriormente⁽⁵⁶⁾ em concentração de uso de 10µM; enzima *TaqMan Universal*; 5 µL do produto obtido após RT-PCR das amostras extraídas, e 2,4µL de água DEPC, totalizando um volume final de reação de 20 µL. Em cada reação foram utilizados controles positivos para o vírus estudado e incluídos também controles negativos. As condições de ciclagem para o protocolo *qPCR* foram: 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C e uma curva de dissociação de 60°C a 95°C.

5.7 Análise de Subtipos do VSR

A curva de dissociação ao final da reação de qPCR, ou análise da temperatura de *melting* (T_m) foi o parâmetro avaliado para diferenciar os VSRH detectados nas amostras positivas como tipo A ou B. A análise de curva de dissociação, ou curva de *melting*, permite a identificação do fragmento amplificado através de uma temperatura específica na qual a metade das cópias de DNA esta na forma de fita simples e a outra metade em dupla hélice, gerando um pico de fluorescência detectado pelo aparelho. A T_m é dependente da

composição do DNA, de modo que um aumento do conteúdo de G+C no DNA gera um incremento na T_m ocasionado pelo maior número de ligações de pontes de hidrogênio⁽⁵⁸⁾.

O VSR A apresenta T_m de 78,25°C, já o VSRB apresenta T_m menor, 74,38°C. Através da observação das curvas apresentadas durante o período final da qPCR e registradas pelo software, pode-se identificar os tipos de VSR presentes naqueles pacientes com resultado positivo no exame. As diferentes T_m entre as sequências dos vírus se dá através de características genômicas próprias, como tamanho da sequência e a quantidade de pares bases nitrogenadas guanina e citosina que compõem sequência alvo no genoma.

5.8 Análise da Carga Viral em amostras dectáveis

A carga viral da amostra foi avaliada com base nos valores de Cts calculados pelo software através dos dados e curvas apresentados durante a amplificação. Amostras com carga viral mais alta apresentam os menores Cts devido à rápida ascensão da curva sigmóide. Quanto maior quantidade de cópias da sequência alvo a amostra apresentar, maior será a quantidade de sinais fluorescentes capturados pelo programa e conseqüentemente mais rapidamente a curva gerada pela amplificação da amostra vai intersepar a linha limite horizontal determinada pelo software - o Treshold⁽⁵⁹⁾.

5.9 Análise dos resultados

Inicialmente os dados foram analisados descritivamente. Para as variáveis categóricas apresentamos frequências absolutas e para frequências relativas às variáveis numéricas e medidas-resumo (média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão). A existência de associação entre as variáveis categóricas foi verificada utilizando-se o teste de Qui-Quadrado (χ^2), ou alternativamente em casos de amostras pequenas, o teste exato de Fisher. A comparação de média entre dois grupos foi realizada utilizando-se o teste t de Student para amostras independentes. A comparação de médias para mais de dois grupos foi realizada por Análise de Variâncias (ANOVA). Para todos os testes estatísticos foi adotado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para realizar as análises estatísticas foi utilizado o software estatístico OpenEpi online (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm). Os gráficos e tabelas foram construídos através do programa Microsoft Office Excel® 2010.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas um total de 86 amostras neste estudo, representando 81 pacientes atendidos no Hospital da Criança e Maternidade, entre 18 dias a quatro anos de idade, com indicação de internação por comprometimento respiratório e suspeita de Infecção Respiratória Aguda, sendo que cinco das amostras investigadas foram coletas necessárias para controle de positividade. Não houve recusa de nenhum pai ou responsável quanto à participação das crianças neste estudo e todas as crianças tiveram fichas clínicas preenchidas. Inicialmente o estudo selecionaria crianças entre zero e 12 anos, porém após

todas as coletas e análises, foi observado que a maior parte dos pacientes estudados apresentaram idade inferior a 1 ano, 6 tiveram idades entre 1 e 2 anos, uma criança apresentou 3 anos de idade e outra foi registrada em questionário com 4 anos de idade. Este fato nos possibilitou dividir o estudo em dois grupos: crianças de até 6 meses e crianças maiores de 6 meses.

As características gerais das crianças incluídas no estudo, bem como seu histórico pessoal, estão registradas na tabela a seguir (tabela 2):

Tabela 2. Características gerais da população estudada e informações de histórico pessoal analisados nas fichas clínicas previamente preenchidas.

Variáveis	N = 81*	%	Positividade de VSR - N (%)
Gênero			
Masculino	40	49,5%	19 (47,5%)
Feminino	40	49,5%	27 (67,5%)
Idade			
Até 6 meses	66	81,5%	39 (59%)
Acima de 6 meses	15	18,5%	3 (20%)
Comorbidades			
Presente	24	29,6%	7 (30%)
Ausente	57	70,38%	37 (65%)
Prematuridade			
Prematuros	30	37,8%	21 (70%)
Não prematuros	51	62,2%	24 (47%)
Palivizumab			
Administrado	8	9,9%	1 (12%)
Não Administrado	73	90,1%	44 (60,3%)
Vacina de Influenza			
Vacinados	13	16,05%	4 (30%)
Não vacinados	68	83,95%	41 (60,3%)

*Um paciente foi registrado como RN e sem informação sobre o sexo.

A média de idade da população que compõe o estudo foi de 5,2 meses, com mediana de três meses, um desvio padrão de 7,6 e range de 47,4 meses. Com valor de P significativo de 0,022, a análise estatística por idade entre amostras positivas e negativas mostrou que a média de idade entre os pacientes positivos (M = 3 meses) foi menor do que a média de idade dos pacientes negativos (M = 7 meses), o que corrobora com a literatura quando o descreve como principal patógeno causador de ITRI em lactentes, sendo que neste grupo o VSR afeta 75% a 80% das crianças doentes^(60,61). Fato que ficou ainda mais evidente na análise estatística entre amostras positivas de pacientes com até seis meses de idade e acima dos seis meses, que apresentou valor de P = 0,003.

O período entre os primeiros sintomas e a data de coleta das amostras das crianças, um dos fatores determinantes para o resultado dos exames, foi de uma média de 7,1 dias, com mediana de seis dias, o que caracteriza, de modo geral, os quadros clínicos como de infecção aguda; desvio padrão de 4,9 e range de 28 dias. Porém 13 fichas apresentaram informações incompletas sobre data de coleta e/ou início de sintomas, inviabilizando uma análise estatística detalhada para estudo deste período.

Das crianças imunizadas com Palivizumab, apenas uma (12%) apresentou resultado positivo para VSR no exame de PCR, porém a mesma não cumpriu o protocolo de imunização, recebendo apenas uma dose do anticorpo no mês de maio de 2016 e se infectando dois meses depois, enquanto entre as não imunizadas, mais de 60% apresentaram detecção de VSR em suas amostras respiratórias. A vacina de Influenza não mostrou relação com os resultados do estudo e a baixa cobertura vacinal registrada se deve ao fato de que a maior

parte dos pacientes investigados acabou apresentando idade inferior a 6 meses e não entram na faixa etária de imunização⁽⁵⁶⁾.

As amostras, coletadas de julho de 2015 a outubro de 2016 em total de 86, apresentaram a distribuição observada na figura 6.

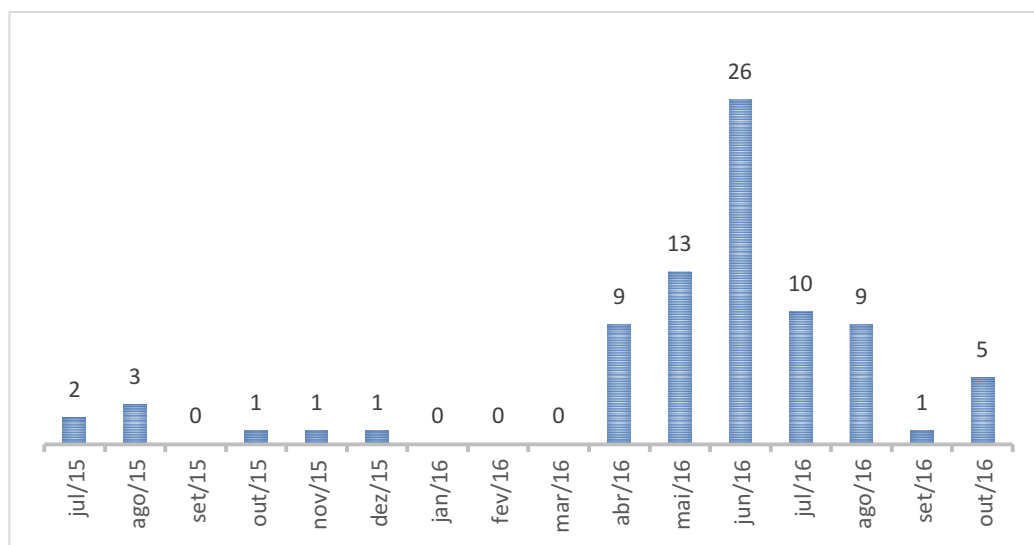


Figura 6. Distribuição de amostras coletadas por mês, para o presente estudo, entre os períodos de julho de 2015 até outubro de 2016.

Podemos observar que um maior número de amostras foi coletado no ano 2016, e principalmente entre os meses de sazonalidade observados para o VSR, período este bem marcado na literatura para a região⁽¹⁶⁾.

A positividade para VSR detectada nas amostras investigadas foi de 55% (figura 7), ou seja, 45 pacientes entre meninos e meninas apresentaram amostras detectáveis no exame de PCR, sendo 33% destas amostras positivas para o VSR B (n=28), enquanto 21% foram positivas para o VSR A (n= 18). Um paciente apresentou resultados positivos para os dois vírus, caracterizando uma coinfeção pelos subtipos A e B. Esta alta taxa de amostras positivas já era

esperada em tal população. O VSR é conhecido como responsável por 75% das bronquiolites em crianças menores de 2 anos e uma frequência de 40% como causador de pneumonias em lactentes⁽⁶⁰⁾. Na cidade de São Paulo, um estudo prospectivo de Calegari et al. revelou que 62,7% das crianças hospitalizadas tinham infecção no trato respiratório inferior, dentre os quais 56,4% tinham um vírus como agente etiológico, sendo que o VSR foi identificado em 52,4% dos casos⁽⁶²⁾.

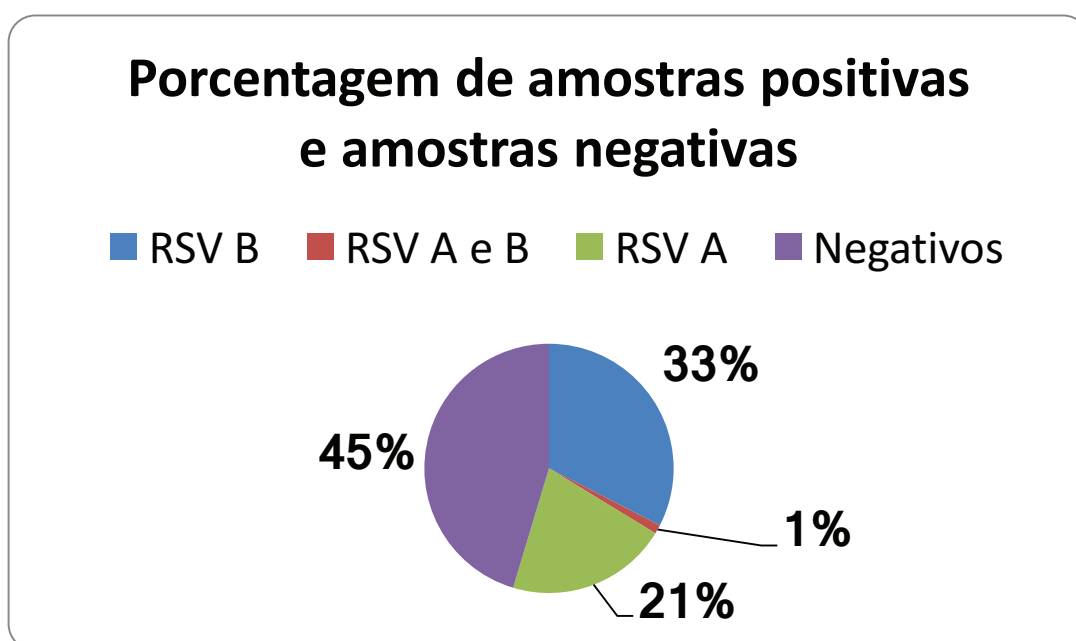


Figura 7. Gráfico representando a porcentagem de amostras positivas e amostras negativas em proporção à população total incluída no estudo.

Das 27 amostras do gênero feminino positivas para VSR, 10 foram positivas para VSR A (37%) e 17 foram detectáveis para VSR B (63%). Das 19 amostras do gênero masculino e positivas para VSR, 8 foram positivas para VSR A (42%) e 11 foram positivas para VSR B (58%). O VSR do tipo B foi o agente que mais atingiu a população estudada, tanto no gênero feminino quanto no

masculino. Não houve valores significativos de P para as análises referentes à positividade em relação à idade e subtipo. Sabe-se, por estudos realizados em diferentes regiões do mundo, que os dois vírus co-circulam na população humana, apresentando o VSR A como mais prevalente^(63,48,64).

Em relação às comorbidades relatadas nas fichas de 24 pacientes, sete destes pacientes apresentaram resultados positivos para VSR, sendo que dois foram detectáveis para VSR A e cinco para VSR B (quadro 2). Todas as comorbidades apresentadas foram descritas na literatura até então, como fatores de risco para gravidade da infecção^(25,65).

Quadro 2. Comorbidade e idade apresentadas pelos pacientes detectáveis para os subtipos do VSR.

Tipo de RSV	Idade	Comorbidade
VSR A	<i>29 dias</i>	<i>Refluxo</i>
VSR A	<i>4 meses</i>	<i>Síndrome Genética</i>
VSR B	<i>3 meses</i>	<i>Cardiopatia Complexa*</i>
VSR B	<i>2 meses</i>	<i>Cadiopatia complexa</i>
VSR B	<i>3 meses</i>	<i>Cardiopatia e Atresia de esôfago*</i>
VSR B	<i>6 meses</i>	<i>Cardiopatia complexa</i>
VSR B	<i>22 meses</i>	<i>Leucomalácia*</i>
<i>* Pacientes de parto premature</i>		

Em relação aos sintomas investigados nas fichas com dados clínicos, foram avaliados valores de P referentes aos pacientes que apresentaram os sintomas e aqueles nos quais o mesmo estava ausente, determinando estes entre positivos e negativos. Na tabela 3, estão descritos todos os achados sintomáticos dos pacientes estudados.

Tabela 3. Sintomas apresentados pelos pacientes do estudo, divididos entre positivos e negativos para VSR.

Sintomas	N Presentes	N Ausentes	Valor de P
<i>CORIZA</i>			
<i>Amostras Positivas</i>	34 (75%)	11 (25%)	<i>P = 0,049</i>
<i>Amostras Negativas</i>	17 (47%)	16 (53%)	
<i>FEBRE</i>			
<i>Amostras Positivas</i>	17 (36%)	30 (64%)	<i>P = 0,49</i>
<i>Amostras Negativas</i>	9 (26%)	25 (74%)	
<i>DISPNÉIA</i>			
<i>Amostras Positivas</i>	45 (97%)	1 (3%)	<i>P = 0,2</i>
<i>Amostras Negativas</i>	30 (88%)	4 (12%)	
<i>TOSSE</i>			
<i>Amostras Positivas</i>	44 (95%)	2 (5%)	<i>P = 0,004</i>
<i>Amostras Negativas</i>	23 (69%)	10 (31%)	
<i>CHIADO</i>			
<i>Amostras Positivas</i>	26 (55%)	21 (45%)	<i>P = 0,029</i>
<i>Amostras Negativas</i>	9 (28%)	23 (72%)	

CIANOSE			
<i>Amostras Positivas</i>	17 (36%)	30 (74%)	<i>P = 0,95</i>
<i>Amostras Negativas</i>	13 (39%)	20 (61%)	

Os sintomas cujos valores de P são significativos foram coriza, tosse e chiado, sintomas bem característicos da bronquiolite causada pelo VSR e já descritos na literatura como indícios da infecção respiratória viral pelos dois subtipos, tanto A quanto B. Esses resultados estão de acordo com o relato da literatura sobre dados clínicos de portadores da infecção por VSR, como Pecchini *et al.*, que apresenta os sintomas clínicos predominantes na infecção respiratória de seu estudo foram coriza e tosse, além do característico chiado⁽⁷⁾.

O gráfico abaixo (Figura 8) traça um comparativo entre as amostras positivas e negativas coletadas, por mês, durante o período do estudo.

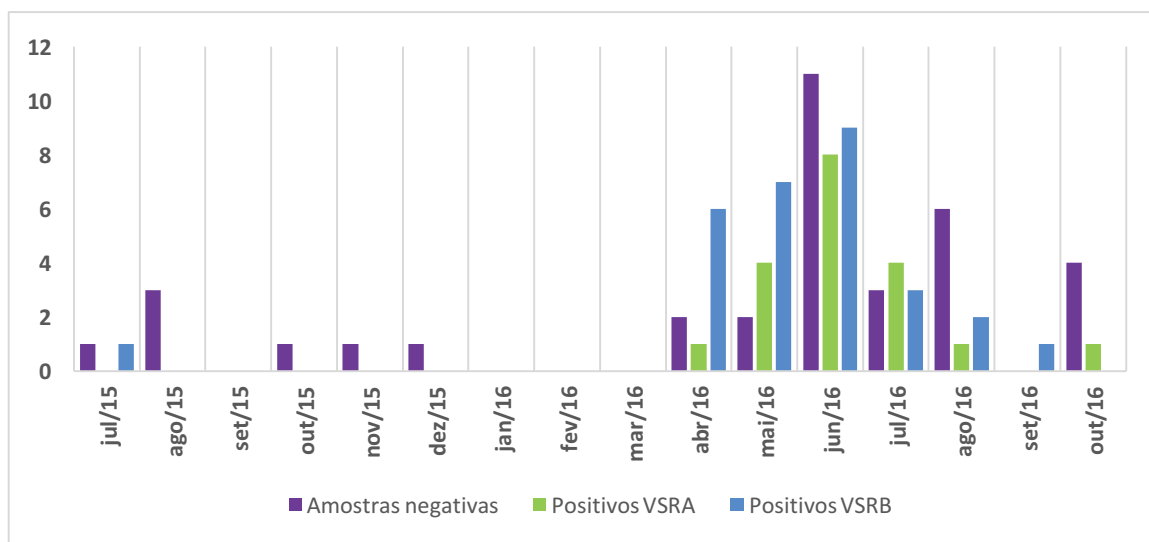


Figura 8. Distribuição de amostras negativas, positivas para VSRA e para VSRB coletadas por mês, no período de Julho/2015 a Outubro/2016.

Pode-se observar que a positividade dos dois tipos de VSR aumenta também junto ao número de amostras negativas, quando ocorre também uma maior quantidade de coletas. Relacionamos isso ao fato de que a sazonalidade do VSR tem impacto no aumento do número de internações por IRA nessa população. Entre os meses de abril de 2016 e setembro de 2016, as colunas de amostras positivas passou a representar a maior proporção se comparado às amostras negativas e o VSRB predominou com exceção do mês de Julho, em que o VSRA foi o agente que mais causou as internações.

Em boletins epidemiológicos já referidos no presente trabalho previamente, acreditamos que a baixa circulação e coleta de amostras no ano de 2015 se deve ao fato de a vigilância epidemiológica municipal e estadual terem enfrentado um grande número de casos de infecção pelo vírus Influenza A H3N2 no inverno, que pode ter deslocado ou inibido o VSR em seus picos de sazonalidade no estado. Já no ano de 2016, houve uma epidemia do vírus H1N1pdm09 no primeiro quadrimestre do ano, o que não apresentou tanto impacto sobre a circulação sazonal de VSR no mesmo ano^(29,30). Variações semelhantes foram observadas no trabalho de Salomão Junior, entre os anos de 2004 a 2005, no mesmo serviço de atendimentos de referência. Neste estudo a maior quantidade de internações foram referentes ao ano de 2005, porém a maior positividade ocorreu no ano anterior. Outros estudos também apresentam variações semelhantes, chamando a atenção para o fato de que a positividade do VSR aumenta conforme há aumento do número de internações e que este último acompanha sempre os picos de sazonalidade do VSR^(36, 66).

Foi realizada análise dos valores de Cts de cada amostra positiva, relacionando estes valores ao subtipo viral do VSR encontrado para verificar a amostras/subtipo com maior carga viral.

Tabela 4. Análise dos valores de Cts em relação aos subtipos virais do VSR (A e B) para avaliar a carga viral.

VSR	Média	Mediana	N	SD
A	21,3	20,0	18	6,1
B	24,5	23,4	28	5,6

O valor de P encontrado, $P = 0,07$, expôs uma tendência de que a carga viral resultante da replicação do VSR A é maior que a do VSR B. Sabe-se que certas linhagens do grupo VSR A possam ter potencial de doença mais grave⁽⁶⁷⁾.

Foi realizada também análise estatística dos valores de Cts encontrados nos subtipos de VSR em relação à idade dos pacientes afetados pelo vírus.

Tabela 5. Análise das Cts de subtipos virais em relação à idade.

VSR B	N	Média	SD	Mediana
< 6 MESES	26	23,90	5,32	23,20
> 6 MESES	2	31,90	3,54	31,90

Os valores de Ct foram claramente menores no grupo de crianças positivas para VRS B abaixo de seis meses, portanto esses pacientes são os que apresentaram maior carga viral. O valor encontrado de P foi 0,059 e também expôs uma tendência de que a carga viral destes vírus possa ser realmente

maior em pacientes infectados até os seis meses de vida. Não foi possível realizar a mesma análise do VSR A, pois somente um paciente acima de 6 meses foi positivo para este subtipo, o que inviabilizou os cálculos.

A análise da amostra denominada número 45, 21 dias, sexo feminino, coletada em 27 de junho de 2016, revelou coinfeção, pois foram detectadas curvas de melting referentes aos dois subtipos do VSR na mesma amplificação (figura 9).

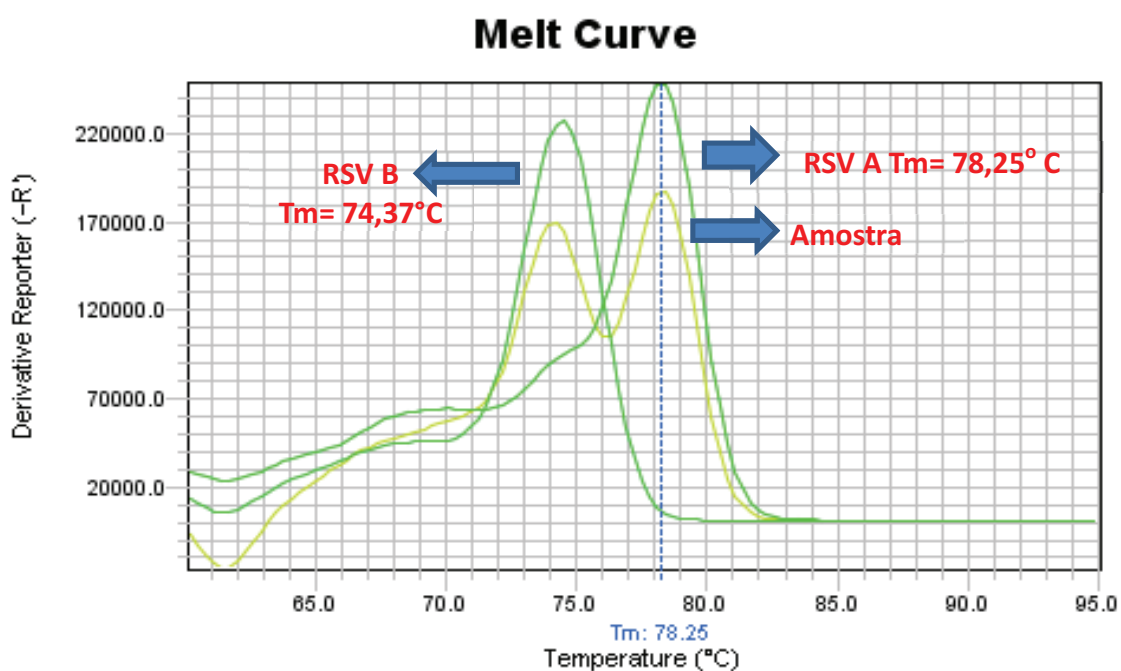


Fig. 9. Imagem das curvas da Tm encontradas no PCR da amostra 45 (linha amarela), comparada às curvas dos controles de VSRA e VSRB (linhas verdes).

Já foi relatada a coinfeção entre o VSR e outros vírus respiratórios como Metapneumovírus, Rinovírus ou Adenovírus⁽⁴⁵⁾. As coinfeções por vírus respiratórios se mostram em uma frequência considerável em lactentes hospitalizados com infecção por VSR. Porém, os resultados desses estudos

sugerem que a associação de outros vírus ao VSR não foi clinicamente relevante e não alterou o prognóstico da infecção na sua fase aguda. Já estudos sobre a coinfeção entre os subtipos do mesmo vírus são escassos. Foi relatado estudo prospectivo, de 2009 a 2013, em que 560 casos de crianças menores de dois anos atendidas por infecção respiratória aguda na cidade de Salvador, BA, foram detectados 139 casos de infecção pelo VSR, sendo 2 destes detectados os dois subtipos de VSR, A e B⁽⁴⁷⁾.

Em outro estudo epidemiológico, na China, amostras respiratórias de 5.483 pacientes menores de 14 anos de idade foram testados para VSR, dentre as quais 729 foram positivas para VSR, porém nenhuma coinfeção de ambos os subtipos foi detectada⁽⁶⁸⁾. Já em estudo realizado no México, em 5629 pacientes com idade acima de um mês, foi detectada a presença de VSR em 399 crianças e 171 adultos. Destes, seis crianças e apenas um adulto apresentaram coinfeção com ambos os subtipos⁽⁴⁸⁾. Devido a falta de estudos a respeito da coinfeção por ambos os subtipos do vírus, não foi possível definir claramente se esta situação implica em maiores complicações.

7. CONCLUSÃO

A ocorrência de infecção por VSR foi alta na população estudada, apresentando uma taxa de 55% de positividade, portanto, o agente mais prevalente como causador das ITRIs nos primeiros seis meses de vida. Uma alta taxa já era esperada devido às características e critérios usados para delimitar

os pacientes selecionados para o estudo, que apresentaram uma medida de idade de 3 meses.

Os parâmetros clínicos e epidemiológicos corroboram com os já descritos na literatura: coriza, tosse e chiado. Com exceção apenas do subtipo viral mais encontrado, VSR B, já que a maior parte dos estudos traz a informação de que o VSR A é o subtipo que predomina em população pediátrica, adultos e idosos.

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a importância de se identificar a ocorrência do VSR em populações de risco auxiliando na construção de medidas de controle e prevenção mais eficazes contra estas infecções.

REFERÊNCIAS

1. Adams JM, Imagawa DT, Zike K. Epidemic Bronchiolitis and Pneumonitis Related to Respiratory Syncytial Virus. *JAMA*. 1961;176(12):1037–1039. doi:10.1001/jama.1961.63040250020020b.
2. Morris JA, Blount, REJr, Savage RE. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. *SAGEJournal*. 1956; 92(3): 544–549. doi:10.3181/00379727-92-22538.
3. Chanock RM, Fox HH, James WD, Bloom HH, Mufson MA. Growth of Laboratory and Naturally Occurring Strains of Eaton Agent in Monkey Kidney Tissue Culture. *SAGEJournal*. 1960; 105(2), 371–375.
- 4 - Volling C, Hassan K, Mazzulli T, Green K, Al-Den A, Hunter P, et al. Respiratory syncytial virus infection-associated hospitalization in adults: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2014;14:665. doi:10.1186/s12879-014-0665-2.
5. Rima, B., Collins, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R., Lee, B., Maisner, A., Rota, P., Wang, L., and ICTV Report Consortium. 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae, *Journal of General Virology*, 98, 2912–2913.

6. Moreira FB. Infecções por Vírus Sincicial Respiratório (VSR) no Período de Dois Anos: Epidemiologia Molecular e Impacto Clínico. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná. 2015.
7. Pecchini R, Berezin EN, Felício MC, Passos SD, Souza MC, Lima LR, et al. Incidence and clinical characteristics of the infection by the respiratory syncytial virus in children admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. *Braz J Infect Dis*. 2008 Dec; 12(6):476-9.
8. Murray, P.R.; Rosenthal, K.S.; Kobayashi, O.S.; Pfaller, M.A. Microbiologia Médica. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
9. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus - A comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013; 45: 331-379.
10. Oliveira AP. Caracterização da nucleoproteína e da fosfoproteína do Vírus Respiratório Sincicial Humano quanto a suas propriedades imunogênicas e de interação com proteínas celulares. [Tese de doutorado] São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2013.
11. Oliveira TF, Freitas GR, Ribeiro LZ, Yokosawa J, Siqueira MM, Portes SA, et al. Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups

in children seen at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 Aug;103(5).

12. Durigon EL. Diagnóstico viral: o que acrescentam os novos métodos? In: Kfour RA, Berezin EN, Almeida F. *Atualização em vírus respiratórios: 2012*. São Paulo: Segmento Farma editores; 2013. p.29-34.

13. Miller EK, Lu X, Erdman DD, Poehling KA, Zhu Y, Griffin MR, et al. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. *The Journal of infectious diseases*. 2007 Mar 15;195(6):773-81.

14. Watanabe ASA, Carraro E, Candeias JMG, Cordeiro MRD, Leal E, Granato CF, Bellei N. Viral etiology among elderly presenting acute respiratory infection, during influenza season. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44(1): 18-21.

15. Arruda E, Jones MH, Escremim de Paula F, Chong D, Bugarin G, Notario G, et al. The burden of single virus and viral coinfections on severe lower respiratory tract infections among preterm infants: a prospective birth cohort study in Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2014; 33(10): 997-1003. doi: 10.1097/INF.0000000000000349.

16. Sociedade Brasileira de Pediatria - SBP. Diretrizes para o manejo da infecção causada pelo vírus sincicial respiratório (VSR). Rio de Janeiro; 2011. Available from:

http://sbp.com.br/pdfs/diretrizes_manejo_infec_vsr_versao_final1.pdf. DIRETRIZES 2017.

17. Kurz H, Herbich K, Janata O et al Experience with the use of palivizumab together with infection control measures to prevent respiratory syncytial virus outbreaks in neonatal intensive care units. *J Hosp Infect* 2008; 70:246–252.

18. Abadesso C, Almeida HI, Virella D et al Use of palivizumab to control an outbreak of syncytial respiratory virus in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2004; 58:38–41.

19. Dizdar EA, Aydemir C, Erdeve O, et al. Respiratory syncytial virus outbreak defined by rapid screening in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2010;75(4):292-4.

20. Bonfim CM, Nogueira ML, Simas PV, et al. Frequent respiratory pathogens of respiratory tract infections in children attending daycare centers. *J Pediatr (Rio J)*. 2011, 87(5), 439-44.

21. Souza PSS. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) have promising anti-hRSV activity through their interaction with viral F protein [dissertation]. São José do Rio Preto (SP): IBILCE/UNESP; 2017.

22. Salomão Junior JB, Gardinassi LG, Simas PV, Bittar CO, Souza FP, Rahal P, Zanetta DM. Human respiratory syncytial virus in children hospitalized for acute lower respiratory infection. *J Pediatr (Rio J)*. 2011 May-Jun 8;87(3):219-24.
23. Broadbent L, Groves H, Shields MD, Power UF. Respiratory syncytial virus, an ongoing medical dilemma: an expert commentary on respiratory syncytial virus prophylactic and therapeutic pharmaceuticals currently in clinical trials. *Influenza Other Respir Viruses*. 2015;9(4):169-78.
24. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse AS, Mietzner TA. *Microbiologia Médica de Jawetz Melnick e Adelberg*. 26ª. McGrawHill. 2014.
25. Kopelman BI, Miyoshi MH. *Infecção pelo vírus sincicial respiratório*. Pediatria Moderna, Moreira Jr editora, 1999.
26. Governo do Estado (SP), Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória. *Boletim Informativo. Síndrome Respiratória Aguda Grave – SRAG / Influenza – SE37/2013*. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde; 2013.
27. Brasil, Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico. Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 53 de 2013*. Brasília, 2013.

28. Brasil, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 52 de 2014. Brasília, 2014.
29. Brasil, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 52 de 2015. Brasília, 2015.
30. Brasil, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 52 de 2016. Brasília, 2014a.
31. Falsey AR, McElhaney JE, Beran J, van Essen GA, Duval X, Esen M, Galtier F, Gervais P, Hwang S, Kremsner P, Launay O, Leroux-Roels G, McNeil SA, Nowakowski A, Richardus JH, Ruiz-Palacios G, Rose SS, Devaster J, Oostvogels L, Durviaux S, Taylor S. Respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in older adults with moderate to severe influenza-like illness. *J Infect Dis.* 2014; 209: 1873-1881.
32. Silveira HL. Clínica e Epidemiologia das Infecções Agudas por Vírus Respiratórios em Crianças atendidas em um Hospital Público de Uberlândia – MG [tese] Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia; 2014.
33. Vieira SE, Stewien KE, Queiroz DA, Durigon EL, Török TJ, Anderson LJ, et al. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001; 43:125-131.

34. João Antunes¹, Marta Chambel¹, Luís Miguel Borrego¹, Sara Prates¹, Virgínia Loureiro² . Infecções respiratórias virais na criança. *Acta Pediátrica Portuguesa Acta Pediatr Port* 2013;44(1):9-14.

35. Respiratory Syncytial Virus. CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/rsv/clinical/index.html>. Acesso em julho 2017.

36. Sparremberger DAH, Azevedo A, Ribeiro AE, Wiemann AFW, de Conto BF, et al. Características epidemiológicas e influência da coinfeção por vírus respiratórios na gravidade da bronquiolite aguda em lactentes. *Sci Med*. 2011;21(3):101-106.

37. Mejias A; Ramilo O. Review of palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial vírus (RSV) in high-risk infants. *Biologics : targets & therapy*, 2008; 2(3), 433-439.

38. Benites CECA, Cabrini DP, Silva ACB, Silva JC, Catalan DT, Berezin EN, Cardoso MRA, Passos SD. Acute respiratory viral infections in pediatric cancer patients undergoing chemotherapy. *J Pediatr* 157: 1-7, 2014.

39. Costa, Lusmaia D.C.; Sucasas Costa, Paulo; Camargos, Paulo A.M. Exacerbation of asthma and airway infection: is the virus the villain? *Jornal de Pediatria*, vol. 90, núm. 6, novembro-diciembre, 2014, pp. 542-555.

40. de Oliveira BRG, Vierall CS, Oliveira MCC. Perfil de morbidade de crianças hospitalizadas em um hospital público: implicações para a Enfermagem. *Rev.Bras Enferm*, Brasília 2012 jul-ago; 65(4): 586-93.

41. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. WHO, 2018.

42. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), part of the National Institutes of Health (NIH). Early-Stage Respiratory Syncytial Virus (RSV) Vaccine Trial Begins. 2018; /www.niaid.nih.gov/news-events/early-stage-respiratory-syncytial-virus-rsv-vaccine-trial-begins.

43. Safadi MAP. Imunoprofilaxia do vírus sincicial respiratório com palivizumabe: o que há de novo? *Rev Paul Pediatr* 2014;32(2):150-1.

44. Ferone EA, Berezin EN, Durigon GS, Finelli C, Felício MC, Storni JG, et al. Clinical and epidemiological aspects related to the detection of adenovirus or respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory tract infection. *J Pediatr (Rio J)*. 2014;90:42-9.

45. De Paulis M, Gilio AE, Ferraro AA, Ferronato AE, Sacramento PR do, Botosso VF et al. Gravidade das coinfeções virais em lactentes hospitalizados com infecção por vírus sincicial respiratório. *J. Pediatr. (Rio J.)* [Internet].

2011 Aug [cited 2019 Feb 27] ; 87(4): 307-313. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572011000400006&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572011000400006>.

46. Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DB, Golono MA, et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *Jornal de pediatria*. 2007 Sep-Oct;83(5):422-8.

47. Bouzas LM, Oliveira JR, Fukutani FK, Borges IC, Brral A, Van der Gucht W, et al. Respiratory syncytial virus a and b display different temporal patterns in a 4-year prospective cross-sectional study among children with acute respiratory infection in a tropical city. *Medicine*, 2016. 95(41): p51.

48. Gamiño-Aryo AE, Moreno-Espinosa S, Llamosas-Gallardo B, et al. Epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections among children and adults in Mexico. *Influenza Other Respi Viruses* 2017; 11: 48-56.

49. Mulholland K. Global burden of acute respiratory infections in children: Implications for interventions. *Pediatr Pulmonol*, 2003.

50. World Health Organization. (2008). WHO Consultation on respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. WHO, 2015. update. Geneva: World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/43942>

51. World Health Organization. (2008). The global burden of disease : 2004 update. Geneva: World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/43942>.

52. Furlan, TM. Estudo da viabilidade para introduzir na rotina testes de diagnóstico para infecção respiratória aguda [tese]. São Paulo: , Faculdade de Medicina; 2016 [citado 2019-03-06]. doi:10.11606/T.5.2016.tde-30062016-161948.

53. Guatura SB, Watanabe ASA, Camargo CN, Passos AM, Parmezan SN, Tomazella TKC, et al. Surveillance of influenza A H1N1 2009 among school children during 2009 and 2010 in São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 Sep-Oct;45(5): 563-6.

54. Kesson AM. Respiratory virus infections. *Paediatr Respir Rev.* 2007;8:240–248.

55. Bergallo M, Terlizzi ME, Astegiano S, Ciotti M, Babakir-Mina M, Perno CF, Cavallo R, Costa C. Real time PCR TaqMan assays for detection of

polyomaviruses KIV and WUV in clinical samples. *J Virol Methods*. 2009;162(1-2):69-74.

56. Gomes EVR, Tolentino FM, Santi MP, Montanha JOM, Watanabe ASA. Situational Assessment of Influenza post 2009 Pandemic - a brief review. *Hansenologia Internationalis: Hanseníase e outras doenças infecciosas*, v. 40, p. 33-45, 2016.

57. Hu A, Colella M, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM (2003) Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:149-154.

58. Becker CE. Utilização da curva de melting como screening para análise dos genótipos A, D e F da hepatite B em pacientes de um hospital geral do Brasil. [Tese de doutorado]. Porto Alegre (RS): UFCSPA; 2012.

59. Oliveira TMS. PCR em tempo real: métodos e aplicações. [Dissertação] Coimbra: Universidade de Aveiro / Departamento de Biologia, 2010.

60. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in Young children. *N Engl J Med*. 2009;360:588-598.

61. Piedimonte G, Perez MK. Respiratory syncytial virus infection and bronchiolitis. *Pediatr Rev*. 2014;35(12):519-30.

62. Calegari T, Queiroz DA, Yokosawa J, Silveira HL, Costa LF, Oliveira TF, et al. Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005 Apr;9(2):156-6.
63. Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *Journal of virology* 2008; 82(5), 2040-2055.
64. Zukurov, JPL. Epidemiologia e caracterização molecular do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) circulantes na cidade de São Paulo no período de 2007 - 2008, São Paulo (SP): Instituto Butantan 2010.
65. Sociedade Brasileira de Pediatria - SBP. Diretrizes para o manejo da infecção causada pelo vírus sincicial respiratório (VSR). Rio de Janeiro; 2011. Available from: http://sbp.com.br/pdfs/diretrizes_manejo_infec_vsr_versao_final1.pdf.
66. Medeiros JAR, Watanabe ASA, Kfoury L, Richette SMQ, Martin JG, Candeias JMG. Frequency of Metapneumovirus in children from Botucatu, SP, Brazil and coinfection with Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV). In: XVII Encontro Nacional de Virologia. Rio de Janeiro, 2006; 11: 171.
67. Martinello RA, Kahn JS. Correlation between Respiratory Syncytial Virus Genotype and Severity of illness. *J Infect Dis*. 2002(186). p. 839 – 42. Disponível

em: <<http://jid.oxfordjournals.org/content/186/6/839.full.pdf+html>>. Acesso: 30 maio de 2015.

68. Chen Z, Zhang L, Tang A. et al. Discovery and Characterization of Phage Display-Derived Human Monoclonal Antibodies against RSV F Glycoprotein. PLoS ONE, 2016; 11(6).

Anexo 1 – FICHA CLÍNICA

Laboratório de Pesquisas em Virologia - FAMERP

Ficha Protocolo Investigação de Vírus Respiratórios – **CRIANÇA**

1ª participação no estudo: SIM NÃO HOSP. NÃO HOSP.
 1ª coleta: SIM NÃO Data: ___/___/___
 Tipo de coleta: SWAB LAVADO NASAL

Identificação

Nome: _____ RG: _____
 Data Nasc. _____ Idade: _____ Sexo: M F
 Telefone: () _____ Horário: _____
 Frequente: Escola Creche Casa
 Resp. pelo paciente: _____

Quadro Clínico Atual

Prematuridade: Sim Não Peso atual: _____ Peso ao nascimento: _____
 Início dos Sintomas : _____ 1º sintoma : _____
 Febre: Sim Não Dias: ___ Temp. máx: ___ Temp. na coleta : _____
 Secreção nasal: Sim Não Dias: _____ Dispnéia: Sim Não Dias: _____
 Tosse: Sim Não Dias: _____ Dor de Garganta: Sim Não Dias: _____
 Chiado: Sim Não Dias: _____ Diarréia: Sim Não Dias: _____
 Cianose: Sim Não Dias: _____ Comorbidade: _____
 RX tórax: Normal Hiper-expansão Infiltrado Condensação
 Uso de medicação: Sim Não Qual: _____
 Vacina Influenza (Gripe): Sim Não Ano: _____
 Palivizumab : Sim Não Data inicio tratamento: _____ Número de doses: _____

Informações Adicionais

Indicação de internação: Sim Não
 Episódios de Doenças Resp. Anteriores: Sim Não Qtos: _____
 Profissional de saúde na família: Sim Não Contato c/ paciente: Sim Não
 Familiar com sintomas: Sim Não Irmãos: Sim Não Idade: _____
 Fumantes: Sim Não
 Vacina Influenza: Sim Não Ano: _____