



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO**  
**PARASITO-HOSPEDEIRO**

**ÍTALO DE ARAÚJO CASTRO**

---

---

**Investigação Molecular de Vírus em Crianças com Infecção  
do Trato Respiratório e Crianças Asmáticas em Goiânia -  
Goiás**

---

---

**Goiânia**  
**2015**

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**      ☒ **Dissertação**      ☐ **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

|                                                |                                                                                                                           |                                                                        |        |        |                    |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------------------|
| Autor (a):                                     |                                                                                                                           | Ítalo de Araújo Castro                                                 |        |        |                    |
| E-mail:                                        |                                                                                                                           | <a href="mailto:italo.a.castro@gmail.com">italo.a.castro@gmail.com</a> |        |        |                    |
| Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? |                                                                                                                           | <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não   |        |        |                    |
| Vínculo empregatício do autor                  |                                                                                                                           | Bolsista                                                               |        |        |                    |
| Agência de fomento:                            |                                                                                                                           | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás                       |        | Sigla: | FAPEG              |
| País:                                          | Brasil                                                                                                                    | UF:                                                                    | G<br>O | CNPJ:  | 08.156.102/0001-02 |
| Título:                                        | Investigação Molecular de Vírus em Crianças com Infecção do Trato Respiratório e Crianças Asmáticas em Goiânia – Goiás    |                                                                        |        |        |                    |
| Palavras-chave:                                | Vírus respiratórios, Asma, Multiplex PCR                                                                                  |                                                                        |        |        |                    |
| Título em outra língua:                        | Molecular Investigation of Viruses in Children with Respiratory Tract Infection and Asthmatic Children in Goiânia - Goiás |                                                                        |        |        |                    |
| Palavras-chave em outra língua:                | Respiratory viruses, Asthma, Multiplex PCR                                                                                |                                                                        |        |        |                    |
| Área de concentração:                          | Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro                                                                                   |                                                                        |        |        |                    |
| Data defesa: (23/04/2015)                      |                                                                                                                           |                                                                        |        |        |                    |
| Programa de Pós-Graduação:                     | Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro                                                                                   |                                                                        |        |        |                    |
| Orientador (a):                                | Fabiola Souza Fiaccadori                                                                                                  |                                                                        |        |        |                    |
| E-mail:                                        | <a href="mailto:fabiolasf@gmail.com">fabiolasf@gmail.com</a>                                                              |                                                                        |        |        |                    |
| Co-orientador (a):*                            |                                                                                                                           |                                                                        |        |        |                    |
| E-mail:                                        |                                                                                                                           |                                                                        |        |        |                    |

\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM      ☐ NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do (a) autor (a)

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**ÍTALO DE ARAÚJO CASTRO**

---

**Investigação Molecular de Vírus em Crianças com Infecção  
do Trato Respiratório e Crianças Asmáticas em Goiânia -  
Goiás**

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
da Relação Parasito-Hospedeiro da  
Universidade Federal de Goiás para  
obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Fabíola Souza Fiaccadori

**Goiânia**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Castro, Ítalo de Araújo

Investigação Molecular de Vírus em Crianças com Infecção do Trato Respiratório e Crianças Asmáticas em Goiânia - Goiás [manuscrito] / Ítalo de Araújo Castro. - 2015.

xi, 77 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Fabíola Souza Fiaccadori.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Cidade de Goiás, 2015.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Vírus respiratórios. 2. Asma. 3. Multiplex PCR. I. Fiaccadori, Fabíola Souza, orient. II. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da  
Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluno (a): Ítalo de Araújo Castro**

**Orientador (a): Fabíola Souza Fiaccadori**

**Membros:**

**1. Fabíola Souza Fiaccadori**

**2. Menira Borges de Lima Dias e Souza**

**3. Paulo Sérgio Sucasas da Costa**

**Data: 23/04/2014**

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Cássio e Heby,  
fonte do meu incentivo e apoio.  
Aos meus avôs e avós, sem os quais  
não haveria um porto seguro e  
confiável chamado família.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pela dádiva da vida, por todas as oportunidades e experiências vivenciadas.*

*Aos meus Pais, pelo empenho ímpar, paciência e apoio. São meus dois moldes fundamentais, sem os quais minha vida não faria sentido. À minha família, pelo carinho e auxílio nas mais diversas situações.*

*À minha namorada, Ana Livia, minha fonte de apoio emocional, pelo amor, carinho, paciência e auxílio durante a conclusão do trabalho. Por todo o incentivo em seguir em frente com meus objetivos.*

*À professora Fabíola Souza Fiaccadori, minha orientadora por quase seis anos consecutivos. Além de exemplo profissional, um exemplo de pessoa a ser seguido. Obrigado por sua gentileza, dedicação, e por todos os ensinamentos nesse período de convivência.*

*Às professoras Menira Souza, Ana Maria Borges, Keili Souza e Divina Cardoso, por toda contribuição e ensinamentos. À Dr<sup>a</sup> Lusmaia Costa, por ter conduzido a parte clínica do trabalho e por toda a cordialidade e companheirismo.*

*A todos os funcionários e alunos que passaram pelo Laboratório de Virologia Humana do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Tâmera, Rodrigo, Kareem, Ana Carla, Terezinha, Tatiane, Vanessa, Lucianna, Denisy, Vitor, Anniely, Francielly, Nathânia, Larissa, Thatielly, Thais Santana, Thais Santos, Romário, Marina, Ivana, Kauan, Elisa, João Paulo e João Vitor. Obrigado pelos ensinamentos, pela ajuda, pela contribuição e, principalmente, pela convivência, tornando a rotina do laboratório muito mais alegre e salutar.*

*Aos grandes amigos Hugo César e Marielton, parceiros de jornada desde a graduação. Obrigado por toda a ajuda no laboratório e companheirismo em todas as situações.*

*Aos membros da banca de qualificação, professores Clayton Borges Luiz, Márcia Alves Dias de Matos e Menira Souza, pela disposição em ler e corrigir meu trabalho e por todas as ponderações e correções feitas. À professora Megmar Aparecida dos Santos Carneiro, pelo auxílio com a análise estatística.*

*Aos amigos do curso de Biomedicina, Bruno Francesco, Izadora, Nayche, Aline, Livia, Duda, Danilo, Yasmim, Hérica, Carolina Inez, Thiago Salgado, Layanny, Dayane, Charles, Eva, Paula, Thainara e todos os biomédicos da turma 31, cuja companhia e amizade me acompanharam durante o percurso e perduram até hoje.*

# SUMÁRIO

|                                                                       |      |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....                                         | vi   |
| <b>LISTA DE QUADROS E FIGURAS</b> .....                               | vii  |
| <b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....                           | viii |
| <b>RESUMO</b> .....                                                   | x    |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                 | xi   |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                                             | 1    |
| <b>1.1 Asma e Exacerbação Asmática</b> .....                          | 1    |
| <b>1.2 Infecções Virais do Trato Respiratório</b> .....               | 3    |
| 1.2.1 Família <i>Orthomyxoviridae</i> .....                           | 4    |
| 1.2.2 Família <i>Paramyxoviridae</i> .....                            | 7    |
| 1.2.3 Família <i>Picornaviridae</i> .....                             | 12   |
| 1.2.4 Família <i>Coronaviridae</i> .....                              | 14   |
| 1.2.5 Família <i>Parvoviridae</i> .....                               | 16   |
| 1.2.6 Família <i>Adenoviridae</i> .....                               | 17   |
| <b>1.3 Aspectos Clínicos das Infecções Virais Respiratórias</b> ..... | 19   |
| <b>1.4 Diagnóstico</b> .....                                          | 23   |
| <b>1.5 Prevenção e Tratamento</b> .....                               | 25   |
| <b>1.6 Epidemiologia</b> .....                                        | 26   |
| 1.6.1 Infecções virais e Exacerbações Asmáticas .....                 | 32   |
| <b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....                                          | 33   |
| <b>3 OBJETIVOS</b> .....                                              | 34   |
| <b>4 METODOLOGIA</b> .....                                            | 35   |
| 4.1 Delineamento e População de Estudo .....                          | 35   |
| 4.2 Coleta de dados e amostras .....                                  | 35   |
| 4.3 Preparo das Amostras Clínicas.....                                | 36   |
| 4.4 Extração do Material Genético.....                                | 36   |
| 4.5 Triagem molecular .....                                           | 37   |
| 4.6 Análise Estatística .....                                         | 41   |
| <b>5 RESULTADOS</b> .....                                             | 42   |
| <b>6 DISCUSSÃO</b> .....                                              | 49   |
| <b>7 CONCLUSÕES</b> .....                                             | 56   |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                              | 57   |
| <b>ANEXOS</b> .....                                                   | 73   |

## LISTA DE TABELAS

---

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados na reação PCRMVR1 .....                               | 36 |
| Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados na reação PCRMVR2 .....                               | 37 |
| Tabela 3. Sequência dos Iniciadores utilizados na reação PCRMVR3 .....                               | 38 |
| Tabela 4. Características da população e índice de positividade viral nas amostras pesquisadas ..... | 40 |
| Tabela 5. Vírus detectados no estudo .....                                                           | 42 |
| Tabela 6. Amostras apresentando co-deteção .....                                                     | 42 |
| Tabela 7. Análise do índice de detecção viral em relação aos grupos de estudo .....                  | 44 |
| Tabela 8. Análise da positividade viral e presença de sintomas para os grupos AE e ITR .....         | 44 |

## LISTA DE QUADROS E FIGURAS

---

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1. Sintomatologia das infecções das Vias Aéreas Inferiores e vírus respiratórios associados .....                                            | 22 |
| Quadro 2. Detecção viral em amostras respiratórias – Levantamento bibliográfico.....                                                                | 29 |
| Figura 1. Representação esquemática do trato respiratório humano .....                                                                              | 21 |
| Figura 2. Positividade para os vírus respiratórios pesquisados .....                                                                                | 44 |
| Figura 3. Positividade viral em relação aos grupos de estudo .....                                                                                  | 45 |
| Figura 4. Variação do índice de detecção viral durante os meses de estudo em relação à (A) precipitação média (B) umidade relativa do ar (UR) ..... | 47 |
| Figura 5. Distribuição dos vírus identificados durante os meses de estudo .....                                                                     | 48 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

|       |                                                   |
|-------|---------------------------------------------------|
| AE    | Asmáticos Exacerbados                             |
| ANE   | Asmáticos não Exacerbados                         |
| ANF   | Aspirado Nasofaríngeo                             |
| ARI   | <i>Acute Respiratory Infection</i>                |
| CAR   | <i>Cocksackie and Adenovirus Receptor</i>         |
| DNA   | Ácido desoxirribonucleico                         |
| dNTP  | Desoxirribonucleotídeo fosfatado                  |
| ECA   | Enzima Conversora de Angiotensina                 |
| EUA   | Estados Unidos da América                         |
| FLU   | Vírus Influenza                                   |
| HAdV  | Adenovírus Humanos                                |
| HBoV  | Bocavírus Humanos                                 |
| HCoV  | Coronavírus Humanos                               |
| HEV   | Enterovírus Humanos                               |
| hMPV  | Metapneumovírus Humanos                           |
| IBGE  | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística   |
| IC    | Intervalo de Confiança                            |
| ICTV  | <i>International Committee for Virus Taxonomy</i> |
| IFI   | Imunofluorescência Indireta                       |
| IFN   | Interferon                                        |
| IL    | Interleucina                                      |
| INMET | Instituto Nacional de Meteorologia                |
| ITR   | Infecção do Trato Respiratório                    |
| ITRI  | Infecção do Trato Respiratório Inferior           |
| ITRS  | Infecção do Trato Respiratório Superior           |
| Kb    | Kilobase                                          |
| LDL-R | Receptor para Lipoproteína de Baixa Densidade     |
| MEM   | Meio Essencial Mínimo                             |
| mRNA  | RNA mensageiro                                    |
| nm    | nanômetros                                        |
| OMS   | Organização Mundial de Saúde                      |
| OR    | <i>Odds ratio</i>                                 |

|      |                                                                     |
|------|---------------------------------------------------------------------|
| ORF  | <i>Open Reading Frame</i> – Região de leitura aberta                |
| PAF  | Fator Ativador Plaquetário                                          |
| Pb   | Pares de bases                                                      |
| PCR  | <i>Polimerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia pela polimerase |
| PIV  | Vírus Parainfluenza                                                 |
| RNA  | Ácido Ribonucleico                                                  |
| RSV  | Vírus Sincicial Respiratório                                        |
| SNC  | Sistema Nervoso Central                                             |
| SRAG | Síndrome Respiratória Aguda Grave                                   |
| TLR  | <i>Toll like Receptor</i>                                           |
| TRI  | Trato Respiratório Inferior                                         |
| TRS  | Trato Respiratório Superior                                         |
| UR   | Umidade Relativa do Ar                                              |
| UTR  | <i>Untranslated Region</i> – Região não traduzida                   |

## RESUMO

---

Infecções agudas do trato respiratório (ITR) representam importante causa de morbidade e mortalidade entre crianças e os vírus constituem os principais agentes etiológicos responsáveis por essas infecções. Além da capacidade de causar doenças com sintomas comuns desde a tosse, coriza, espirros, febre e obstrução nasal, estão frequentemente associados à exacerbação de quadros de asma, condição clínica crônica mais frequente em crianças cuja prevalência vem aumentando nos últimos anos. Considerando a população de asmáticos, os dados epidemiológicos relacionando infecções respiratórias virais e asma no Brasil são escassos. Neste contexto, o presente estudo objetivou investigar a ocorrência de infecções por vírus respiratórios em população pediátrica asmática e não asmática da cidade de Goiânia – Goiás. Para isso, entre agosto de 2012 e agosto de 2013 foram coletadas 225 amostras de aspirado nasofaríngeo e/ou swab nasal de crianças entre quatro e 14 anos de idade, as quais foram submetidas à triagem molecular para detecção de 16 vírus respiratórios, por meio de três protocolos de Multiplex *Nested*-PCR. Das 225 amostras, 42 apresentaram positividade para pelo menos um vírus. Amostras de quatro pacientes apresentaram mais de um vírus detectado. Os índices de detecção viral encontrados para pacientes apresentando ITR (25%), asma exacerbada (16,3%) e asma estável (14,8%) não apresentaram diferenças significativas. Os vírus mais frequentemente detectados foram os Rinovírus (28,6%), Influenza A (FLUA) (11,9%), Adenovírus (11,9%), Bocavírus Humanos (HBoV) (11,9%) e Vírus Sincicial Respiratório A (RSV) (9,5%). Maiores índices de detecção viral foram observados durante a estação chuvosa da região, período de maior precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar (UR). Dentre as amostras positivas, os RSV foram detectados nos meses de maior precipitação pluviométrica e UR, enquanto os FLU e HBoV foram detectados durante os meses de inverno coincidindo com a estação seca. Os demais vírus não apresentaram perfil sazonal definido. Os dados obtidos ressaltam a importância dos agentes virais na população pediátrica. Embora o índice de detecção viral não tenha sido significativo entre os pacientes apresentando asma exacerbada e asma estável, a presença desses agentes infecciosos em crianças constitui um fator a ser considerado ao traçar-se estratégias de prevenção e controle dos quadros de ITR, e seu impacto em quadros preexistentes de asma. Além disso, os resultados agregam conhecimento sobre a circulação e sazonalidade desses patógenos, uma vez que este é o primeiro estudo visando a detecção molecular de vírus respiratórios em crianças na região Centro-Oeste.

**Palavras Chave:** Vírus respiratórios, Asma, Multiplex PCR

## ABSTRACT

---

Acute respiratory infection (ARI) is a major cause of morbidity and mortality worldwide, particularly among children, and most of these infections are caused by viruses. Respiratory viral infections can cause symptoms ranging cough, coryza, sneezing, fever and airflow obstruction. Furthermore, the infection poses as an important trigger of asthma exacerbation, frequent clinical condition in children, and its prevalence has been rising in the last years. There are few epidemiologic studies analyzing the relationship between ARIs and asthma in Brazil. Based on this background, the aim of the study was investigate the occurrence of viral respiratory infections in pediatric patients with and without asthma in Goiânia – Goiás. Between august, 2012 and august, 2013 225 nasal aspirates and/or nasal swab samples were obtained from children with four to 14 years old. The samples were screened by Multiplex Nested-PCR for detection of 16 common respiratory viruses. From 225 samples, 42 had at least one virus detected. Samples from four different patients had more than one virus detected. The viral detection rate in ARI patients (25%), exacerbated asthma (16.3%) and stable asthma (14.8%) showed no significant difference. The most frequent viruses detected were Rhinovirus (28.6%), FLUA (11.9%), Adenovirus (11.9%), HBoV (11.9%) and RSVA (9.5%). The monthly detection rate was higher during the rainy season, period marked by great rainfall and high relative air humidity. Among the positive samples, RSV were detected during the great rainfall months and high air humidity, while the FLU and HBoV were detected during the winter months, period with low air humidity in the Mid-West region. The seasonal profile from the other viruses was unclear. The obtained results reinforces the importance of the viral pathogens in the pediatric population. Although the viral detection rate was not statistically significant, the presence of these pathogens in children is an important matter for consideration, especially to delineate control and prevention measures concerning ARIs and its impact on preexistent asthma. Hence, this study is the first of the kind in the region, and the data provided tried to fill the knowledge gaps about seasonality and circulation of these pathogens.

**Keywords:** Respiratory viruses, Asthma, Multiplex PCR

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Asma e Exacerbação Asmática

Asma é a condição clínica respiratória crônica mais frequentemente observada em crianças. Os sintomas da doença geralmente surgem nos primeiros anos de vida, apresentando diferentes fenótipos, que podem cursar de forma variável progredindo para crises com menor ou maior gravidade, gerando encargos pessoais e sociais, com reflexo direto na qualidade de vida dos indivíduos envolvidos (Masoli et al. 2004).

Estimativas apontam que cerca de 30% das crianças ocidentais sejam afetadas pela asma, com aumento de sua prevalência nos últimos anos (Dougherty & Fahy 2009, Jackson et al. 2011). O Brasil apresenta um dos maiores índices de prevalência dos sintomas relacionados à asma da América Latina. Em 2011 foram registradas pelo DATASUS, 160 mil hospitalizações por asma em todas as idades, dado que a colocou como a quarta causa de internação no Brasil (SBPT 2012).

A asma pediátrica tem demonstrado relevância, sendo melhor compreendida e caracterizada para esta faixa etária. Estudos indicam um consenso quanto à idade relacionada com o surgimento dos primeiros sintomas característicos deste quadro, entre cinco e 12 anos (Papadopoulos et al. 2012).

Com relação à persistência, asma é geralmente classificada em intermitente ou persistente. Quanto à severidade, branda, moderada e severa (Papadopoulos et al. 2012). A condição apresenta-se como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas levando a episódios recorrentes de dispneia, aperto torácico, sibilância e tosse particularmente noturna ou no início da manhã. Os sintomas estão geralmente associados a fatores tais como: obstrução generalizada, mas variável das vias aéreas, hiper responsividade do epitélio brônquico assim como alterações estruturais crônicas do epitélio (remodelamento) (Jackson & Johnston 2010, Tregoning & Schwarze 2010, Papadopoulos et al. 2012, Kurai et al. 2013).

Adicionalmente, diferentes fatores têm sido relacionados ao desencadeamento de crises asmáticas com gravidade variável. Dentre estes, polimorfismos genéticos, exposição a poluição e alérgenos, exercício físico, tabagismo familiar e infecções respiratórias exercem papel relevante, constituindo alvo para ações, medidas de prevenção e escolha do tratamento (Bacharier et al. 2008, Tesse et al. 2011, Tischer et al. 2011). Ainda, a exposição contínua a esses fatores tem sido considerada fator importante no agravamento e exacerbação dos sintomas da asma (NIH 2007, Jackson et al. 2011, Bekmesian et al. 2013, Fu & Tsai 2014).

Nesse contexto, uma condição peculiar chama atenção pelo seu impacto e associação à alta morbidade e mortalidade. Essa condição é comumente denominada exacerbação asmática, ataque asmático ou simplesmente episódio asmático (Fu & Tsai 2014). A definição para exacerbação asmática ainda permanece controversa e divergente, embora uma tentativa tenha sido feita recentemente para definir o quadro clínico em questão. Segundo o Consenso Internacional em Asma Pediátrica (*International consensus – ICON – on pediatric asthma*), exacerbação asmática corresponde a um episódio agudo ou subagudo de aumento progressivo nos sintomas da asma, associado à obstrução das vias aéreas (GINA 2012, Papadopoulos et al. 2012). Alguns autores ainda adicionam a essa definição a necessidade de cuidados médicos sem prévia consulta, hospitalizações e internações em unidades de urgência (Fuhlbrigge et al. 2012).

O papel de infecções respiratórias em quadros preexistentes de asma e outras doenças respiratórias crônicas está bem estabelecido na literatura. As infecções bacterianas e virais apresentam grande significância em comparação ao conjunto de todos os patógenos responsáveis por infecções do trato respiratório, com maior destaque e predominância dos agentes virais (Nagayama et al. 2007, El Sayed Zaki M et al. 2009, Sandrock & Norris 2015).

Desde a década de 70 já é postulada a importância dos agentes virais como desencadeadores de exacerbação asmática (Lambert & Stern 1972, Minor et al. 1974). Com o avanço das tecnologias moleculares de detecção a partir dos anos 90 o papel das infecções virais foi extensamente comprovado, inclusive com a caracterização de diferentes vírus antes desconhecidos (Jackson et al. 2011).

Destaca-se entre os agentes causadores de infecção aguda em crianças os Rinovírus e Vírus Sincicial Respiratório (RSV), este mais encontrado em crianças hospitalizadas com bronquiolite e com menos de dois anos de idade (Jackson et al. 2011). A literatura tem relatado um padrão similar nos índices de episódios infecciosos entre indivíduos saudáveis e asmáticos. Assim, entre asmáticos a importância da infecção do trato respiratório inferior está na tendência de apresentarem sintomatologia mais severa e de maior duração (Sandrock & Norris 2015).

Apesar dos avanços na padronização de medicamentos direcionados ao tratamento e ainda, o desenvolvimento de programas de controle da asma (Stirbulov et al. 2006) a ocorrência de quadros de exacerbações respiratórias agudas têm constituído a principal causa de morbidade e mortalidade associada à asma (Dougherty & Fahy 2009). O tratamento é direcionado quase unicamente aos sintomas da asma e baseia-se no uso de broncodilatadores inaláveis, administração de oxigênio suplementar em vistas de corrigir a hipóxia e administração de corticosteroides sistêmicos, preferencialmente por via oral e nas fases iniciais dos eventos sintomáticos (Papadopoulos et al. 2012).

A prevenção da exacerbação, em oposição ao tratamento do episódio agudo uma vez estabelecido, pode reduzir o impacto social e financeiro das exacerbações asmáticas. Isso pode ser obtido ao direcionar os esforços para os diversos agentes desencadeadores do quadro clínico exacerbado (Jackson et al. 2011). Algumas abordagens têm sido propostas com o intuito de evitar que infecções virais venham a desencadear quadros de exacerbação em pacientes asmáticos. Tais abordagens são evidenciadas em dois cenários diferentes: a supressão da resposta imune do tipo Th2 formulada pelo paciente, direcionando-a para um padrão Th1 e a prevenção da infecção pelos vírus e interferência em seu ciclo replicativo. O primeiro cenário seria possível após terapia com interferon tipo 1 (IFN – I) e terapia com agonistas TLR7/8 (*Toll-like Receptor*). Já o segundo, seria possível também por terapia com IFN-I, vacinação (restrita às vacinas atualmente disponíveis), uso de antivirais e imunoterapia (Dhariwal et al. 2013).

Uma vez evidenciado o papel dos agentes citados, com ênfase para os agentes infecciosos, a detecção e identificação de fatores desencadeadores surge como ferramenta essencial para a prevenção e manejo dos casos de exacerbação dos sintomas da asma (Sandrock & Norris 2015).

## **1.2 Infecções Virais do Trato Respiratório**

As infecções virais do trato respiratório superior e inferior figuram entre as mais frequentes doenças infecciosas em humanos, principalmente em crianças. Significativos índices de morbi-mortalidade estão associados às infecções virais respiratórias na população pediátrica. Estima-se que sejam responsáveis por cerca de quatro milhões de óbitos anualmente em todo o globo, sendo que crianças com idade inferior a seis anos são as mais afetadas (Nair et al. 2011, Berry et al. 2015). No Brasil, no ano de 2013 foram notificados mais de 36 mil casos de síndrome respiratória aguda grave de etiologia viral, e mais de 4 mil óbitos (Brasil 2013).

Os principais agentes virais responsáveis por infecções agudas do trato respiratório são membros de seis importantes famílias: *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Adenoviridae*, *Coronaviridae* e *Parvoviridae*. Com o advento de metodologias mais sensíveis vem sendo possível a detecção de novos vírus relacionados ao quadro infeccioso respiratório, como os Metapneumovírus, Coronavírus, Bocavírus e dois Poliomavírus, KIV e WUV (Sloots et al. 2008, Huijskens et al. 2012).

### 1.2.1 Família *Orthomyxoviridae*

A família *Orthomyxoviridae* é caracterizada por vírus de genoma constituído por RNA fita simples, segmentado e polaridade negativa. Atualmente a família é composta por seis gêneros, dentre estes, os vírus pertencentes aos gêneros *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C* tipicamente infectam células do trato respiratório em humanos e outras espécies animais (ICTV 2013).

Os vírus Influenza compartilham características comuns à família, sendo envelopados, pleomórficos, medindo cerca de 100 nanômetros (nm) de diâmetro. Em seu envelope se inserem as glicoproteínas Hemaglutinina (HA), Neuraminidase (NA) e M2 para os Influenza A; Hemaglutinina, Neuraminidase, NB e BM2 para os Influenza B e HEF e CM2, para os Influenza C. Abaixo do envelope a proteína M1 compõe um envoltório proteico denominado “matriz”, circunscrevendo as proteínas NEP/NS2 bem como os fragmentos de RNA genômico, oito para Influenza A e B e sete para os Influenza C. Os fragmentos de RNA se encontram cobertos por diversas cópias da nucleoproteína (NP), em associação com a polimerase viral (composta de três proteínas, PB1, PB2 e PA) constituindo o complexo denominado ribonucleoproteína (RNP) (Shaw & Palese 2013).

O genoma viral se organiza de forma que cada segmento de RNA codifica para pelo menos uma proteína. Para os Influenza A, o primeiro segmento, de cerca de 2,3 kilobases (kb), codifica para a proteína PB2, componente da RNA polimerase. O segundo segmento, também de 2,3 kb, apresenta duas regiões de leitura aberta (ORF – *Open Reading frame*), sendo a mais extensa delas codificante para a proteína PB1, outro componente da RNA polimerase e a segunda para PB1-F245r. Os quatro fragmentos seguintes (2,2 kb; 1,7 kb; 1,5 kb e 1,4 kb) codificam ordenadamente para as proteínas PA, HA, NP e NA. O sétimo fragmento de 1 kb também apresenta uma segunda ORF gerada pelo processamento alternativo do RNA, codificando para as proteínas M1 e M2. De forma semelhante, o oitavo fragmento (890 pares de bases – pb) codifica para as proteínas NS1 e NEP/NS2, as quais apresentam função de antagonista IFN; transporte dos complexos RNPs durante a replicação e regulação da síntese de RNA, respectivamente (Fouchier et al. 2005, Thomas & Noppenberger 2007).

A organização genômica se mantém semelhante para os Influenza B, exceto pela ausência de uma segunda ORF no segundo segmento; a inclusão de uma ORF no sexto segmento, codificando a proteína NB e a manutenção de uma segunda ORF no sétimo segmento, gerada por inserção de um novo códon de início na posição 248 pb (Shaw & Palese 2013). Para Influenza C, observa-se que a disposição dos genes entre os fragmentos de RNA

difere sutilmente. Os dois primeiros fragmentos codificam para as proteínas PB1 e PB2 e, os três fragmentos seguintes codificam para as proteínas P3, HEF e NP. O sexto fragmento codifica para as proteínas CM1 e CM2 e o sétimo fragmento, de forma homóloga aos Influenza A e B, codifica para as proteínas NS1 e NEP/NS2 (Shaw & Palese 2013).

As glicoproteínas de superfície do vírus Influenza A, Hemaglutinina e Neuraminidase, são consideradas as proteínas mais antigênicas da partícula viral e com maior variabilidade. Assim, até o momento foram descritos 18 subtipos antigênicos da Hemaglutinina (H1-18) e 11 subtipos da Neuraminidase (N1-11), o que compõe a base da classificação dos vírus Influenza A (Fouchier et al. 2005, Wong & Yuen, 2006, Russel et al. 2008). Dois mecanismos contribuem para a alta variabilidade destes vírus, denominados *Drift* e *Shift*. O primeiro consiste em mutações pontuais ao longo do genoma viral e o segundo em recombinações a nível de fragmentos inteiros, em situações onde um hospedeiro está infectado por duas ou mais linhagens diferentes do vírus. Ressalta-se ainda o impacto desses mecanismos quando ocorrem especificamente nos genes codificantes das duas proteínas mais antigênicas do vírus, Hemaglutinina e Neuraminidase (Shaw & Palese 2013).

Devido ao papel que desempenham na replicação viral, as proteínas de Matriz (M), Nucleoproteína (NP) e NS (1 e 2) não apresentam grande variabilidade. Consequentemente, os genes respectivos têm sido utilizados com frequência como alvos específicos para amplificação em diversas metodologias, permitindo a detecção de múltiplos subtipos antigênicos em um mesmo ensaio (Coiras et al. 2003, Moore et al. 2004, Ebner et al. 2005, Pierangeli et al. 2007).

A replicação viral ocorre nas células superficiais do trato respiratório. As partículas virais emergem da superfície apical das células acumulando-se no lúmen, limitando a disseminação sistêmica e contribuindo com a transmissão para outros hospedeiros. O sítio preferencial para replicação depende da concentração de receptores específicos compostos de ácido siálico, com os quais se liga a proteína de superfície HA (Wright et al. 2013). O pico de replicação viral e concomitante excreção ocorre dois dias após a inoculação, decaindo em seguida até o oitavo dia. Em crianças, a excreção viral pode durar até mais de 13 dias após o início dos sintomas (Frank et al. 1985).

Dentre os sintomas das infecções pelos vírus Influenza destacam-se: febre alta (38 – 40°C), cefaleia e mialgia, bem como tosse, congestão nasal, chiado e complicações graves no trato respiratório inferior, como pneumonia e bronquite entre crianças de até três anos, durante os meses de inverno (Heymann et al. 2004, Inoue & Shimojo 2013, Thangavel & Bouvier 2014). Os vírus Influenza C esporadicamente causam infecções sintomáticas no trato

respiratório superior e raramente são associados a complicações no trato respiratório inferior (Shaw & Palese 2013).

Os vírus Influenza A são conhecidos por serem capazes de infectar uma gama relativamente grande de diferentes espécies de hospedeiros, incluindo aves, suínos, equinos, cães e humanos. Ocasionalmente a infecção é também detectada em felinos e mamíferos aquáticos. Influenza B e C infectam uma parcela menor de espécies. O primeiro tem como hospedeiro mais frequente os humanos, embora também tenha sido isolado de mamíferos aquáticos, e os Influenza C tipicamente infectam humanos, cães e suínos (Kaplan & Webby 2013, Wright et al. 2013, Cauldwell et al. 2014). Linhagens provenientes de aves aquáticas, consideradas o reservatório natural do vírus, podem se tornar capazes de infectar outras espécies em decorrência da alta taxa de variabilidade genética apresentada pelos vírus Influenza, conforme referido. Uma vez superadas as barreiras interespecíficas e ocorrida a adaptação à nova espécie, linhagens de origem animal podem causar surtos epidêmicos e pandêmicos na população humana esporadicamente (Cauldwell et al. 2014).

Pandemias de Influenza são surtos que abrangem grande extensão geográfica e afetam grande parcela da população mundial em um curto período de tempo. Importantes situações ocorrem em intervalos de 10 a 40 anos, ressaltando-se as pandemias ocorridas em 1918 (H1N1), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2), o surto ocorrido em 2006 (H5N1) e recentemente a pandemia H1N1 em 2009 (Wright et al. 2013).

Uma das mais conhecidas pandemias da história, a “Gripe Espanhola” de 1918-19 é considerada o evento mais impactante já registrado, levando a óbito aproximadamente 50 milhões de pessoas mundialmente, taxa de mortalidade duas vezes maior do que a registrada pela Primeira Guerra Mundial (Taubenberger et al. 2012). O agente etiológico responsável só foi isolado cerca de 15 anos após a pandemia. Com a evolução das técnicas de amplificação e detecção de material genético a partir dos anos 80 foi possível a recuperação de sequências degradadas de tecidos preservados, e posteriormente a reconstrução do genoma viral (Tumpey et al. 2005). Foi demonstrado que se tratava de uma variante H1N1 do vírus influenza A com taxa de identidade considerável em relação à variante H1N1 responsável pela pandemia em 2009 (Morens et al. 2009).

Aproximadamente quarenta anos depois, uma pandemia teve início no sudeste asiático e se espalhou globalmente. Em 1957 o vírus foi isolado no Japão e identificado como subtipo H2N2, apresentando segmentos de origem aviária. Estima-se que a pandemia tenha causado cerca de 1,5 milhões de óbitos, em um período de dez anos (Webster & Govorkova 2014). Em sucessão, a linhagem H2N2 pandêmica foi completamente substituída por uma linhagem H3N2

isolada em Hong Kong, 1968, durante um surto que rapidamente atingiu o status de pandemia. Embora tenha se disseminado rapidamente, a severidade do surto não se compara às pandemias anteriores, fato justificado provavelmente pela imunidade ao subtipo 2 da Neuraminidase adquirida no episódio anterior (Wright et al. 2013).

Apesar de não ter constituído uma pandemia e não ter relativo impacto mundialmente, o surto originado na Ásia e Oriente Médio em 1997 chamou a atenção para a possibilidade de linhagens completamente aviárias estabelecerem como novo hospedeiro o homem. O vírus isolado foi caracterizado como subtipo H5N1, altamente patogênico. Atualmente o vírus continua a causar surtos esporádicos no Oriente Médio e na Europa, mas o pico de maior número de infecções notificadas em humanos ocorreu no ano de 2006. Em 2014, levantamento global indicou 650 casos com 386 fatalidades (Webster & Govorkova 2014).

A mais recente pandemia registrada teve início em uma pequena cidade do México, em abril de 2009. Durante o mesmo mês foram detectados vírus com alta taxa de identidade (caracterizados como subtipo H1N1) em outras localidades do México e no sul dos EUA. Após a detecção de casos em diferentes continentes a OMS caracterizou o surto como pandemia. De origem suína e aviária, o vírus predominou sobre as variantes sazonais entre 2009 e 2010, causando uma pandemia de intensidade moderada, com cerca de 100.000 óbitos mundialmente (Wright et al. 2013, Webster & Govorkova 2014). No Brasil, durante o triênio da pandemia (2009 – 2011) foram confirmados 51.636 casos, dos quais 2.194 evoluíram para óbito (Brasil 2012).

### **1.2.2 Família *Paramyxoviridae***

Classificam-se nesta família vírus envelopados e de genoma composto por RNA fita simples polaridade negativa, ressaltando a semelhança e a proximidade com a família *Orthomyxoviridae*. Segundo a classificação mais recente do ICTV (*International Committee for Virus Taxonomy*), a família é composta pelas subfamílias *Paramyxovirinae* e *Pneumovirinae*, contendo sete e dois gêneros, respectivamente. Na família, três vírus merecem destaque por causarem doença respiratória aguda, os Parainfluenza, Vírus Sincicial Respiratório e Metapneumovírus (ICTV 2013).

São descritos quatro vírus Parainfluenza (PIV) de interesse humano, os quais estão classificados na subfamília *Paramyxovirinae*, em dois gêneros diferentes, *Respirovirus* (PIV1 e PIV3) e *Rubulavirus* (PIV2 e PIV4) (ICTV 2013).

Estruturalmente os PIV apresentam envelope viral contendo duas glicoproteínas (HN e F). A proteína HN medeia a ligação a resíduos de ácido siálico presentes na superfície celular, durante a fase de adsorção, e a subsequente clivagem desses resíduos durante a etapa de liberação das novas partículas virais. O gene HN tem sido utilizado com frequência como alvo para amplificação e consequente emprego em técnicas de detecção molecular, por apresentar regiões características de cada sorotipo viral, permitindo a distinção entre eles (Mahony 2008). Já a proteína F está relacionada à etapa de fusão do envelope viral com a membrana celular.

Abaixo do envelope observa-se uma segunda camada constituída pela proteína de Matriz, ou M. O nucleocapsídeo apresenta simetria helicoidal, composto pela proteína N, ao qual encontram-se associadas as proteínas L e P, que juntas apresentam função de transcriptase reversa (Lamb & Parks 2013). O genoma viral consiste de RNA fita simples, polaridade negativa, contendo cerca de 15,5 kb. A ordem dos genes no sentido 3' – 5' da molécula é a mesma para todos os sorotipos, N, P, M, F, HN e L, que parcialmente determina a ordem temporal de expressão em RNAs subgenômicos separados (Karron & Collins 2013).

O gene P codifica para mais de uma proteína, denominadas proteínas acessórias, as quais variam entre os PIV. Dos produtos secundários do gene P, os mais significativos são as proteínas acessórias C e V, ambas com função relacionada à evasão da resposta imunológica formulada pelo hospedeiro (Schomacker et al. 2012). A proteína C é codificada por uma ORF sobreposta à ORF principal do gene P, presente apenas nos PIV pertencentes ao gênero *Respirovirus* (PIV1 e 3). Por outro lado, a proteína V é um produto quimérico entre parte da ORF principal P e a ORF V, também sobreposta ao gene P. Dos PIV, apenas os PIV1 não expressam a proteína V, enquanto que os PIV3 apresentam uma expressão baixa ou inexistente (Rochat et al. 1992, Durbin et al. 1999, Schomacker et al. 2012).

A replicação viral ocorre em grande escala nas células epiteliais do trato respiratório, mais especificamente nas células ciliadas presentes na superfície do lúmen (Zhang et al. 2005, Schaap-Nutt et al. 2010). Embora apresente tempo de excreção de três a dez dias após a infecção, em pacientes adultos, e de três a quatro semanas em crianças, não observa-se viremia em indivíduos saudáveis. Esse fato pode ser explicado pelo tropismo restrito e pela liberação exclusiva da progênie viral pela superfície apical das células do trato respiratório (Schomacker et al. 2012, Karron & Collins 2013).

Quatro sorotipos (1-4) dos PIV foram caracterizados como causadores de infecção em humanos (Waner 2012), embora o sorotipo 4 seja raramente relatado. Os PIV como um todo são responsáveis por cerca de 6 a 30% das hospitalizações por doença respiratória não-bacteriana em crianças (Griffin et al. 2004), cujos sintomas se caracterizam principalmente por

resfriado comum, crupe, bronquite, bronquiolite, pneumonia e casos de exacerbação de asma (Henrickson 2003, Karron & Collins 2013). Destacam-se os sorotipos PIV-1 e PIV-3 por serem os mais prevalentes, e ainda associados a quadros clínicos respiratórios também na população adulta. Em estudo conduzido por Frost et al. (2013) em população pediátrica, a relevância dos sorotipos 1 e 3 é evidenciada, detectados em 33 e 19% das amostras positivas para PIV, respectivamente. Entretanto, o mesmo estudo também ressalta a inesperada prevalência do sorotipo 4, detectado em 31% das amostras positivas para algum PIV (Azevedo et al. 2003, Liu et al. 2013, Frost et al. 2013).

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (RSV) é membro da subfamília *Pneumovirinae* e pertence ao gênero *Pneumovirus*, juntamente com a variante bovina (BRSV) e o Vírus da Pneumonia Murina (ICTV 2013). Primeiramente isolado em 1956, o RSV é considerado o agente etiológico mais importante causador de doença respiratória durante a infância, principalmente antes dos dois primeiros anos de vida (Mahony 2008, Collins & Karron 2013).

A partícula viral, de 100 a 350 nm de diâmetro, consiste em um nucleocapsídeo de simetria helicoidal, envolvido primeiramente em uma camada proteica formada pela proteína M e externamente por um envelope lipoprotéico, no qual estão ligadas as glicoproteínas G, SH e F, que se projetam como espículas virais. A proteína G apresenta papel fundamental na etapa de adsorção viral, se ligando a glicosaminoglicanos, constituintes do glicocálice presente na superfície celular. Assim como observado para os PIV, a proteína F é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana celular. Já a proteína SH consiste em um pequeno polipeptídeo que apresenta-se na superfície viral na forma de pentâmeros, cuja função especula-se ser de canal iônico, alterando a permeabilidade celular (Collins & Karron 2013). O nucleocapsídeo é formado pela proteína N em associação ao RNA genômico, bem como às proteínas P, M2-1 e L. O genoma consiste de RNA fita simples, polaridade negativa, não segmentado e com cerca de 15,2 kb. Os dez genes presentes no genoma (NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-1/2 e L) são transcritos sequencialmente da extremidade 3' até a extremidade 5' em mRNAs separados (Barik 1993).

O epitélio das vias respiratórias e tecido pulmonar constituem o sítio de infecção dos RSV. A replicação viral e liberação da progênie ocorre exclusivamente nas células da superfície apical e não se estende às camadas basais do epitélio, ao contrário do que é observado para os vírus Influenza (Zhang et al. 2002). Nos estágios subsequentes da replicação, a expressão da proteína F na superfície celular acarreta a fusão da membrana celular com células vizinhas, levando à formação da estrutura sincicial característica (Collins & Karron 2013). Estudos

inferem um tempo de excreção variando de um a 14 dias em crianças, com média de 4,5 dias (4.0 – 5.3, IC 95%). Além disso, infecções primárias e gravidade do quadro clínico são fatores relacionados à excreção viral prolongada (médias de 5,1 e 5,6 dias respectivamente) (Okiro et al. 2010). Em adultos, a excreção viral pode ocorrer por aproximadamente dez dias, com picos de replicação entre dois e três dias (1.5 – 4.1, IC 95%) (Walsh et al. 2013).

O RSV é classificado em dois subgrupos antigênicos, RSV – A e RSV – B, inicialmente a partir da reatividade diferenciada do vírus frente a anticorpos monoclonais direcionados à glicoproteína G (Mufson et al. 1985), e atualmente com base em sua divergência genética. Apesar da detecção diferencial poder ser realizada pela amplificação de regiões contidas nos genes F, N ou P (Mahony 2008, Bawage et al. 2013), o sequenciamento e análise filogenética da segunda região hiper variável do gene G têm sido a base para a classificação em genótipos dos subgrupos A e B. Dessa forma, o subgrupo A pode ser classificado em 11 genótipos (ON-1, GA1 – GA7, SAA1, NA1 e NA2) assim como o subgrupo B em 23 genótipos (BA1 – BA12, GB1 – GB4, SAB1 – SAB 4, URU1 – URU2 e THB) (Eshaghi et al. 2012, Auksornkitti et al. 2014). Não está claro até o momento a relação entre a diversidade de subtipos e genótipos com a gravidade dos sintomas associados à infecção (Tabatabai et al. 2014), por outro lado, a alta carga viral em amostras de aspirado nasofaríngeo já é um fator bem caracterizado como agravante dos quadros clínicos (Sullender 2000, Campanini et al. 2007).

Estima-se que cerca de 70% de todas as crianças já tiveram um caso de infecção por RSV até o primeiro ano de vida, e 100% até os dois anos, com os sintomas variando de resfriado comum a bronquite e bronquiolite (Cane 2001, Kuehni et al. 2009). Além disso, estudos sugerem que quadros de bronquiolite causados pela infecção por RSV estão relacionados com o desenvolvimento e/ou exacerbação de asma durante a infância (Henderson et al. 2005, Sigurs et al. 2010). Reinfecções também são frequentes, com quadros sintomáticos moderados, sugerindo o papel da variabilidade genética dos RSV na manutenção da circulação viral (Scott et al. 2007, Tran et al. 2013).

Os Metapneumovírus Humanos (hMPV) foram primeiramente descritos no ano de 2001 (Van Den Hoogen et al. 2001) e adicionados à família *Paramyxoviridae*, gênero *Metapneumovirus*, juntamente com os Metapneumovírus aviários (aMPV) (ICTV 2013).

Estruturalmente, as partículas virais do hMPV se assemelham bastante ao RSV, encontradas nas formas esféricas e filamentosas. O diâmetro das partículas esféricas varia de 150 a 600 nm, com as espículas virais medindo cerca de 17 nm. As demais estruturas proteicas seguem o mesmo arranjo estrutural apresentado pelos RSV (Collins & Karron 2013).

O genoma viral também mantém uma semelhança considerável com o genoma dos RSV, mantendo cerca de 50% de homologia. As diferenças encontradas são o tamanho (genoma dos hMPV 2kb menor), a falta dos genes NS1 e NS2, e a ordem diferente dos genes, seguindo a sequência N, P, M, F, M2-1/2, SH, G e L nos hMPV (Feuillet et al. 2012).

Os genes F e G codificam respectivamente as proteínas de fusão (F) e de ligação (G), que constituem as principais glicoproteínas de superfície viral. A proteína F é responsável por mediar as etapas de adsorção e penetração do ciclo replicativo, por ligação e fusão com a membrana celular. Além disso, possui determinantes antigênicos alvos de anticorpos neutralizantes (Herfst & Fouchier 2008). A proteína G tem papel na adsorção viral via interações não específicas com glicosaminoglicanos presentes na superfície celular (Thammawat et al. 2008). Os genes M e P apresentam considerável grau de conservação, mesmo entre os diferentes genótipos virais, característica responsável por serem utilizados frequentemente como alvo para amplificação por técnicas de detecção (Lopez-Huertas et al. 2005). Por outro lado, os genes F e G codificam as proteínas mais susceptíveis à pressão do sistema imune e à variação, portanto são utilizados como a base para a classificação filogenética dos hMPV em dois genótipos, A e B, e quatro subgrupos, A1, A2, B1 e B2 (Van Den Hoogen et al. 2004). Ademais, o subgrupo A2 é ainda dividido em duas linhagens, A2a e A2b (Huck et al. 2006). A associação dos genótipos com o curso dos quadros clínicos ainda é incerta, contudo, sugere-se que o genótipo A esteja relacionado à sintomatologia mais grave (Martinello et al. 2002, Arnott et al. 2013).

Assim como os RSV, os hMPV apresentam tropismo para o trato respiratório, especialmente células epiteliais da superfície luminal. Em contraste com outros membros da família *Paramyxoviridae*, o tempo de excreção viral tende a ser maior, onde os maiores títulos de partículas excretadas são observados entre seis a oito dias após a infecção. A alta carga viral excretada também está intimamente ligada à presença de quadros sintomáticos mais graves (Talaat et al. 2013, Roussy et al. 2014).

Os hMPV têm sido relacionados a infecções respiratórias agudas (IRAs) em todas as faixas etárias (Collins & Karron 2013), com elevada morbidade entre crianças, idosos e adultos imunocomprometidos (Falsey et al. 2003, Williams et al. 2005). Entre pacientes hospitalizados, o impacto das infecções por hMPV é alto, comparável com as infecções pelo RSV, inclusive com casos de co-infecção relatados (Malekshahi et al. 2010).

### 1.2.3 Família *Picornaviridae*

Pertencem à família dos picornavírus 26 gêneros diferentes, destes apenas no gênero *Enterovirus* são identificados patógenos associados à infecção respiratória aguda. Neste gênero estão classificadas três espécies de Rinovírus (A, B e C) e ainda nove espécies de Enterovírus humanos (HEV A – H, J), sendo que nas espécies A, B, C e D são identificados tipos associados a infecções respiratórias (Tapparel et al. 2009, ICTV 2013).

As características marcantes dos vírus dessa família são a ausência de envelope viral, tamanho da partícula viral relativamente pequeno e genoma constituído de RNA fita simples polaridade positiva (Racaniello 2013). Morfologicamente compartilham uma mesma estrutura esférica, com os vírions medindo cerca de 30 nm. As partículas virais apresentam um único capsídeo proteico, composto pelas proteínas VP1-4, e sua estabilidade em diferentes faixas de pH varia de acordo com o gênero em questão. Alguns membros do gênero *Enterovirus* são estáveis em pH 3,0 ou inferior, o que facilita a replicação no trato gastrointestinal. Entretanto, os Rinovírus se diferenciam dos demais e, assim como outros componentes do gênero *Aphthovirus* apresentam maior estabilidade em faixas de pH próximas a 6,0, o que é consonante com o sítio de replicação desses agentes virais, preferencialmente no trato respiratório (Racaniello 2013).

O genoma viral consiste de RNA fita simples, polaridade positiva, variando de 7 a 8.8 kb e organiza-se de forma semelhante entre os gêneros que compõe a família (Knowles et al. 2012). A extremidade 5' não codificante (UTR) da molécula, alvo de diversos ensaios moleculares de detecção por caracterizar-se como uma região mais conservada, é covalentemente ligada à proteína VPg, que apresenta um resíduo de tirosina cujo grupamento 3' OH está diretamente relacionado com o início da síntese do RNA genômico (Steil & Barton 2009). O genoma codifica para uma poliproteína precursora clivada posteriormente, originando 10 – 12 proteínas isoladas. Após a extremidade 5' não traduzida encontram-se as regiões codificantes para as proteínas estruturais (VP1 – 4), seguidas das proteínas não estruturais (2A – 2C e 3A - 3D). Por fim a extremidade 3' apresenta uma cauda poliA de tamanho variável (Yogo & Wimmer 1972, Tapparel et al. 2013).

Estruturalmente os Rinovírus apresentam o padrão morfológico da família *Picornaviridae*. A infecção ocorre primariamente no epitélio do trato respiratório, em temperaturas variando de 33 a 35°C, embora também sejam capazes de se replicar nas porções inferiores do trato respiratório (Gern & Palmenberg 2013). A presença de dois receptores específicos determina o tropismo viral. Rinovírus das espécies A e B utilizam o receptor ICAM-

1, e na ausência deste, o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R) (Hao et al. 2012). O receptor celular utilizado pelos Rinovírus espécie C durante a etapa de adsorção ainda é desconhecido, no entanto, estudos em modelos de cultivo celular ressaltam que não se trata de nenhum dos receptores utilizados pelas espécies A e B (Hao et al. 2012, Basta et al. 2014).

As espécies de Rinovírus são definidas considerando a constituição dos genes VP1, VP4/VP2 e mais recentemente a análise do genoma inteiro. Essas espécies são ainda subclassificadas em sorotipos, A (79), B (30) e C (68), totalizando 177 tipos (Bochkov et al. 2011, Picornaviridae 2012). Essa diversidade não se reflete no tropismo viral, uma vez que a maioria destes se restringe ao trato respiratório superior, entretanto recentes relatos têm demonstrado ainda a possibilidade da infecção atingir também o trato respiratório inferior, estando associada à exacerbação de condições crônicas pré-existentes, como asma e doença pulmonar crônica obstrutiva (Gern 2010, Kherad et al. 2010, Edwards et al. 2012).

Os Rinovírus da espécie A são os mais representativos epidemiologicamente, seguido pelos Rinovírus C e B (Garcia et al. 2013), no entanto, dados sobre virulência e prevalência epidemiológica ainda são escassos (Tapparel et al. 2011, 2013). Lu et al. (2014), em estudo conduzido em crianças com infecção aguda do trato respiratório na China, encontraram índice relevante de prevalência da infecção por Rinovírus C, embora ainda inferior ao observado para a espécie A. Ao avaliar a gravidade dos quadros clínicos, foi observada correlação positiva entre a infecção por Rinovírus C e sintomatologia mais grave (OR 1.89,  $p = 0.022$ , IC 95%) (Lu et al. 2014).

Conforme descrito, os Enterovírus (HEV) se diferenciam dos outros vírus do gênero primeiramente pelas características físico-químicas. Apresentam estabilidade em meio ácido e são resistentes a diversos compostos, como etanol 70% e isopropanol, além de solventes orgânicos, como éter e clorofórmio (Pallansch et al. 2013).

O receptor CD155, molécula pertencente à superfamília das imunoglobulinas, consiste no receptor celular utilizado pelos HEV durante a etapa de adsorção, e consiste no fator determinante da amplitude de hospedeiros possíveis, uma vez que está presente apenas em humanos e em primatas (Pallansch et al. 2013). A infecção é bem caracterizada pela transmissão ocorrendo via oral, seguida de replicação no trato respiratório, o que difere dos rinovírus, embora infecção pela via respiratória também seja possível (Tapparel et al. 2013).

Historicamente os HEV têm sido classificados em espécies e sorotipos (ou apenas tipos). Até o momento 4 espécies foram descritas de enterovírus humanos, HEV-A, HEV-B, HEV-C e HEV-D. Membros da mesma espécie compartilham identidade superior a 70% em relação à composição proteica da poliproteína, bem como das proteínas não estruturais 2C, 3C

e 3D (Pallansch et al. 2013). A análise da sequência nucleotídica do gene VP1 é a base para a classificação em tipos virais. Os HEV agrupam 107 tipos, distribuídos entre as quatro espécies, A (22), B (60), C (21) e D (4) (Picornaviridae 2012).

Diversos tipos virais estão relacionados à replicação no trato respiratório, os quais vêm sendo caracterizados de forma mais precisa em decorrência da implementação de técnicas moleculares de detecção independentes de cultivo celular. A gravidade dos sintomas clínicos aparentemente não apresenta relação com o tipo viral, mas fatores como a presença de comorbidades e idade dos pacientes podem influenciar no desenvolvimento da infecção. Além disso, casos de infecção do trato respiratório inferior por HEV têm sido descritos como fatores associados a quadros de exacerbação de asma e pneumonia pré-existentes (Freymuth et al. 1999, Jacobson et al. 2012).

#### **1.2.4 Família *Coronaviridae***

Os primeiros coronavírus foram isolados na década de 30, a partir de amostras veterinárias, de animais como ratos e porcos. Em humanos, os primeiros coronavírus de interesse foram identificados na década de 60 (Tyrrell & Bynoe 1966). A nomenclatura da família adveio justamente da análise eletromicrográfica das partículas virais presentes nessas amostras, cujo arranjo superficial das proteínas no envelope assume a forma de coroa (Masters & Perlman et al. 2013).

Segundo o ICTV, a família *Coronaviridae* se subdivide em duas subfamílias, *Coronavirinae* e *Torovirinae*. A subfamília *Coronavirinae*, por sua vez, agrupa quatro gêneros, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus*, destes, apenas os gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* agrupam vírus que infectam humanos (*Human coronavirus* - HCoV) e com tropismo para o trato respiratório (HCoV-229E; HCoV-OC43; HCoV-NL63; HCoV-HKU1; SARS-CoV; MERS-CoV) (ICTV 2013).

As partículas virais são envelopadas, esféricas, com diâmetro medindo cerca de 100 – 160 nm. Abaixo do envelope encontra-se o RNA genômico associado a várias cópias da fosfoproteína N, formando o nucleocapsídeo helicoidal. Alguns vírus da família apresentam ainda um segundo capsídeo icosaédrico circunscrevendo o RNA viral, o que, no entanto, não se aplica aos coronavírus respiratórios. No envelope viral estão adsorvidas as glicoproteínas S, a principal espícula viral cuja função está ligada à adsorção e penetração na célula hospedeira; a proteína de membrana (M), e as proteínas de envelope (E) (Lai et al. 2007).

O genoma viral consiste em RNA fita simples, polaridade positiva (ssRNA+) apresentando de 28 a 32 kb. A organização genômica entre os componentes da família é bastante semelhante. Nas extremidades 5' e 3' observa-se duas UTRs de comprimento variável, cuja função está relacionada à replicação e transcrição viral. O restante do genoma contido entre essas duas regiões apresenta de sete a 14 ORFs sobrepostas. As duas primeiras ORFs, 1a e 1b, codificam uma poliproteína precursora do complexo proteico responsável pela transcrição/replicação do material genético. Seguem-se as ORFs responsáveis por codificar as proteínas estruturais, S, E, M, N, intercaladas por várias pequenas regiões codificantes para proteínas não-estruturais (Lai et al. 2007). Destes, os genes S e N têm se mostrado como alvos promissores para a amplificação e utilização no diagnóstico molecular diferencial entre as variantes virais (Coiras et al. 2004, Mahony 2008).

Assim como a maioria dos vírus RNA a variabilidade genética dos coronavírus é muito grande, em especial pelo método de replicação descontínuo do genoma, o que gera taxas de recombinação genética de até 25%, inclusive com vírus de outras famílias (Luytjes et al. 1988, Baric et al. 1990, Geng & Tan 2013).

Como citado anteriormente, até o momento seis coronavírus diferentes foram reconhecidos como agentes de infecções respiratórias em humanos, HCoV-229E; HCoV-OC43; HCoV-NL63; HCoV-HKU1 e os zoonóticos SARS-CoV e MERS-CoV. Estudos epidemiológicos indicam que esses agentes virais circulam mundialmente, seguindo padrões sazonais distintos dependendo da região (Lee & Storch 2014). Desses, a variante OC43 é a mais comumente encontrada. SARS-CoV, NL63 e HKU1 foram descritos em 2003, 2004 e 2005 respectivamente (Pyrce et al. 2007), enquanto os MERS-CoV foram descritos mais recentemente no Oriente Médio, apresentando patogenicidade semelhante aos SARS-CoV (McIntosh 2013).

Os HCoV utilizam diferentes receptores celulares durante a etapa de adsorção. Os membros do gênero *Alphacoronavirus*, HCoV-229E e NL63 utilizam aminopeptidase N e ECA2 (enzima conversora de angiotensina), respectivamente. Já os  $\beta$ -Coronavírus, HCoV-OC43 e SARS, utilizam o ácido N-acetilneuramínico e ECA2, respectivamente (Masters & Perlman 2013). As vias de transmissão utilizadas pelos HCoV são a respiratória e eventualmente a via fecal-oral, e a replicação inicial ocorre nas células do trato respiratório superior, com o ápice da excreção viral ocorrendo entre três a quatro dias após a inoculação de partículas infecciosas (Masters & Perlman 2013). A disseminação para o trato respiratório inferior e outros tecidos está mais relacionada com as variantes SARS e MERS, causadoras de síndrome respiratória grave (Berry et al. 2015).

As infecções por HCoV apresentam um espectro variado de manifestações clínicas, desde manifestações moderadas a síndromes respiratórias mais graves (Bastien et al. 2005, Pyrk et al. 2006). De todas as formas clínicas, crupe é a mais relacionada com a infecção por HCoV variante NL-63, enquanto sintomas comuns como rinorreia, febre, tosse e sibilância estão mais associados à infecção por HCoV-HKU1 (Van der Hoek et al. 2005, Lau et al. 2006). Além dos sintomas autolimitados do trato respiratório superior, as infecções podem apresentar alta morbimortalidade ao atingir o trato respiratório inferior, em casos de bronquiolite, pneumonia e exacerbações asmáticas (Woo et al. 2005, Lau et al. 2006).

Os agentes SARS-CoV e MERS-CoV foram relatados recentemente como causadores de síndromes respiratórias graves, caracterizadas por pneumonia, falência renal, retenção urinária, febre persistente, mialgia e sintomas gastrointestinais, com possível evolução ao óbito (Al-Tawfiq 2013, Memish et al. 2013). Os MERS-CoV apresentam similaridade aos SARS quanto à sintomatologia, embora apresentem taxa de mortalidade mais elevada, chegando a 30%, principalmente envolvendo população fechada e contato contínuo, como profissionais da área da saúde e surtos nosocomiais (Assiri et al. 2013, De Sousa et al. 2014).

### **1.2.5 Família *Parvoviridae***

A família inicialmente é dividida em duas subfamílias, *Densovirinae* e *Parvovirinae*. A primeira agrupa vírus que infectam artrópodes e a segunda, vírus que infectam aves e mamíferos (Allander et al. 2005, ICTV 2013).

Considerando quadros respiratórios e a subfamília *Parvovirinae*, merecem destaque os recentemente descritos Bocavírus humanos (HBoV), incluídos no gênero proposto *Bocaparvovirus* (ICTV 2013), sendo o primeiro vírus a ser detectado por técnicas de triagem molecular baseadas em amplificação randômica de material genético e sequenciamento de larga escala (Allander et al. 2005, Jartti et al. 2012).

Assim como os demais parvovírus, os HBoV são vírus não envelopados, de simetria icosaédrica, medindo cerca de 25 nm de diâmetro. O capsídeo é composto por duas proteínas virais, VP1 e 2. O genoma viral é composto por DNA de fita simples, com 4 – 6 kb, e organiza-se em quatro regiões de leitura aberta, codificantes para as proteínas NS1, NP1, VP1 e VP2. As proteínas VP1 e VP2 se diferenciam apenas na extremidade amino-terminal, pois as duas regiões de leitura aberta são sobrepostas e a síntese diferencial utilizando dois códons de início diferentes gera as duas proteínas distintas (Allander et al. 2005, Chen et al. 2010). O genoma

dos HBoV não codifica uma enzima DNA polimerase, levando à necessidade da utilização da enzima celular durante a replicação viral (Chow & Esper 2009).

Os genes NS1 e NP1 são comumente utilizados como alvos para ensaios de detecção baseados em amplificação de fragmentos genômicos (Mahony 2008), enquanto a análise da constituição do gene VP1 subsidia a classificação dos Bocavírus humanos em quatro espécies, HBoV1 a 4. Divergências na sequência nucleotídica superiores a 8% definem espécies diferentes enquanto que divergências maiores do que 5% em genes não estruturais definem subtipos virais (Kapoor et al. 2009, 2010).

Os HBoV1 são patógenos de distribuição global, com sequências de DNA detectadas em 2 - 19% dos casos de infecção respiratória aguda, predominantemente em crianças de seis a 24 meses de idade (Ksiazek et al. 2003, Allander et al. 2005, Pyrk et al. 2007). Podem se manter detectáveis em indivíduos imunocomprometidos por até seis meses após a infecção aguda (Esper et al. 2005, Palmenberg et al. 2009). Além de amostras do trato respiratório e gastrointestinal, os HBoV1 têm sido encontrados em amostras de soro, urina e saliva, mas o papel da possível viremia e disseminação sistêmica ainda é incerto (Allander et al. 2005, Jartti et al. 2012). Os HBoV2, 3 e 4 são predominantemente encontrados em amostras de fezes, embora sem evidências concretas de replicação no epitélio intestinal (CDC 1997, Nishizawa et al. 1997, Van den Hoogen et al. 2001, Jartti et al. 2012). Dos vírus citados, apenas o HBoV2 foi relatado também em amostras do trato respiratório e pode estar relacionado com infecções respiratórias agudas (Falsey et al. 2003, Rohde et al. 2005).

A infecção pelos HBoV1 apresenta sintomatologia clínica similar a outras infecções respiratórias. Tosse, otite média, rinorreia são manifestações comuns do trato respiratório superior. No trato respiratório inferior a infecção pode levar a casos de pneumonia, sibilância, exacerbação asmática e bronquiolite (Chow & Esper 2009, Wang et al. 2010).

#### **1.2.6 Família *Adenoviridae***

A família *Adenoviridae* é composta por cinco gêneros: *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Mastadenovirus* e *Siadenovirus*. Somente os adenovírus pertencentes ao gênero *Mastadenovirus* possuem importância para humanos, e podem ainda infectar diversos mamíferos como morcegos, bovinos, porcos e símios (ICTV 2013). Os adenovírus do gênero *Mastadenovirus* são ainda subdivididos em sete espécies (A – G), classificados de acordo com suas características biológicas, imunológicas, genéticas e bioquímicas. Considerando cada espécie, 52 sorotipos foram reconhecidos até o momento, classificados por meio de reações de

soroneutralização, e agrupados da seguinte forma: espécie A (Ad12, 18, 31), espécie B (Ad3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50), espécie C (Ad1, 2, 5, 6), espécie D (Ad8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51), espécie E (Ad4), espécie F (Ad40 e 41) e espécie G (Ad52) (Jones et al. 2007, Wold & Ison 2013). Recentemente foi proposta uma classificação mais abrangente, definindo 68 tipos diferentes de Adenovírus humanos com base em sua sequência genômica completa (Seto et al. 2011, Ghebremedhin 2014).

As partículas virais não envelopadas apresentam aproximadamente 90 nm de diâmetro e morfologia icosaédrica, cada vértice contendo uma fibra proteica. O vírion é composto por 11 proteínas, sendo que destas as proteínas II (Hexon), III (Penton), IIIa, IV (componente da fibra), VI, VIII e IX compõem o capsídeo viral e as proteínas V, VII, X e TP (Proteína Terminal) compõem o core, que juntamente com o capsídeo envolvem o DNA genômico (Berk 2013).

O genoma viral é composto por DNA linear fita dupla (dsDNA), contendo de 26 – 45 kb. Os gêneros da família apresentam organização genômica distinta, de forma que os vírus do gênero *Mastadenovirus* apresentam cinco grandes regiões codificantes, E1, E2B, E2A, E3 e E4 contendo genes em ambas as fitas e transcritas em ordem temporal condizente com a função de seus transcritos no ciclo replicativo viral (Davison et al. 2003). A maioria dos ensaios moleculares descritos para detecção dos Adenovírus amplificam um produto da região E2A, especificamente o sítio correspondente ao gene H (Proteína II ou proteína do Hexon) (Mahony 2008).

A ligação inicial à superfície celular e posterior adsorção viral é mediada pelas fibras proteicas presentes no capsídeo, as quais se ligam a uma proteína transmembrana denominada CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor* – Receptor comum Coxsackievírus e Adenovírus). A proteína CAR é um dos componentes das junções celulares apresentando domínios extracelulares da família das imunoglobulinas, e é expressa consideravelmente em diversos tecidos, como miocárdio, tecido prostático, SNC, pulmões e tecidos hepáticos. A disseminação para outras áreas do trato respiratório e outros tecidos pode estar relacionada com a expressão excessiva das fibras proteicas, as quais se ligam aos receptores CAR nas superfícies basolaterais desestabilizando os complexos juncionais entre as células (Berk 2013).

Os adenovírus diferem-se bastante quanto ao sítio de infecção, e causam uma grande variedade de manifestações clínicas, tais como sintomas respiratórios, cistite hemorrágica aguda, meningoencefalite, sintomas gastrointestinais e miocardite, de acordo com o sorotipo em questão. Os casos de infecção respiratória estão relacionados aos sorotipos 1 – 7, 11, 14, 16, 21, 30, 37 e 50 cujo tropismo pelo trato respiratório já foi descrito em estudos posteriores (Metzgar et al. 2007, Brosch et al. 2009). As infecções respiratórias por adenovírus apresentam

quadro sintomático moderado na maioria dos casos, incluindo febre, rinite, faringite e tosse, embora possam apresentar também quadros como laringite, crupe e pneumonia (AAP 2003, Bicer et al. 2013).

Além disso, as infecções por adenovírus contribuem com mais de 7% dos casos de exacerbação dos sintomas de asma causados por infecções virais (McErlean et al. 2010).

### **1.3 Aspectos Clínicos das Infecções Virais Respiratórias**

Apesar da grande diversidade descrita de agentes virais sabidamente causadores de infecções no trato respiratório, os mecanismos de transmissão são muito semelhantes, podendo ocorrer por contato direto pessoa a pessoa através de aerossóis produzidos durante a fala, tosse, espirro e também pelo contato com superfícies contaminadas (Barker et al. 2001, Boone & Gerba 2007).

Observa-se ainda que certos fatores como baixas temperaturas e baixa umidade associados à ventilação reduzida e aglomeração de pessoas em ambientes fechados, facilitam a transmissão viral (Lowen et al. 2007). Além disso, na maioria dos casos as infecções respiratórias virais são autolimitadas, com um curto período de incubação, cerca de um a cinco dias (McDevitt et al. 2010).

As células epiteliais do trato respiratório constituem o sítio primário de infecção, e apesar da gama de vírus respiratórios, muitos compartilham os mesmos receptores e moléculas de superfície durante a etapa de adsorção à membrana celular (Varki & Varki 2007). A disponibilidade dos receptores está diretamente relacionada com a primeira etapa da replicação viral, constituindo inclusive um ponto de regulação durante a infecção, como observado nas infecções por Rinovírus onde a expressão de moléculas ICAM-1 é aumentada através da via fator NF- $\kappa$ B dependente (Papi & Johnston 1999, Jacobs et al. 2013).

Após penetração nas células epiteliais, replicação intensa e lise celular, os vírus respiratórios podem acarretar a necrose de células ciliadas e não ciliadas da superfície do epitélio, a perda dos cílios e interferência na produção e secreção de muco, comprometendo um importante mecanismo local de defesa (Aherne et al. 1970). As partículas virais infecciosas são então liberadas na superfície apical das células e se acumulam no lúmen do trato respiratório, favorecendo sua disseminação (Stelzer-Braid et al. 2009).

O dano celular causado em decorrência dos sucessivos ciclos replicativos virais é extenso e contribui significativamente com o estabelecimento da doença, mas não corresponde ao único fator envolvido na patogênese das infecções respiratórias. Observa-se que as

manifestações clínicas podem ser resultado da presença de co-infecção por outros patógenos e também dos impactos da resposta imune formulada após contato com as partículas virais, principalmente em casos de hiper responsividade imune (Tregoning & Schwarze 2010).

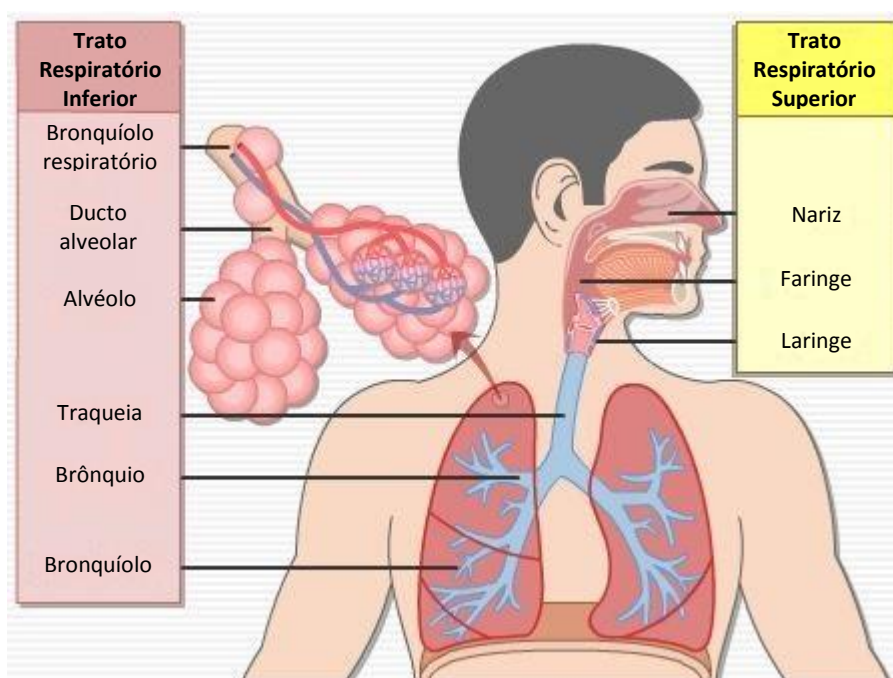
Uma consequência peculiar das infecções por vírus respiratórios é a susceptibilidade aumentada para infecções bacterianas oportunistas (Tregoning & Schwarze 2010). Dois aspectos das infecções virais estão relacionados com o aumento do risco de infecções por patógenos como *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*. Primeiramente, a destruição da camada superficial do epitélio do trato respiratório em decorrência da replicação viral facilita o estabelecimento de infecções bacterianas. Alguns vírus em específico facilitam esse processo pela dissociação dos complexos juncionais presentes entre as células epiteliais, como é o caso dos Rinovírus (Sajjan et al. 2008). Além disso, as infecções virais facilitam a adesão de patógenos bacterianos pela indução da expressão em grandes quantidades de receptores celulares, como os receptores para PAF (*platelet-activating factor* - Fator Ativador Plaquetário) e ICAM-1 (Wang et al. 2009). Estudos avaliando o impacto das co-infecções bacterianas nos quadros clínicos sugerem a forte correlação com o risco aumentado de readmissão hospitalar, mais evidente em pacientes com doença pulmonar crônica obstrutiva e asma (Wark et al. 2013).

A infecção e posterior dano de células brônquicas epiteliais levam à liberação de mediadores pró-inflamatórios, que abrangem uma vasta gama de citocinas e quimiocinas, como IL-1, IL-6, CXCL8/IL-8, GM-CSF, CCL-5 e CXCL-10. O resultado da liberação desses mediadores é um recrutamento celular intenso de linfócitos e eosinófilos, bem como hiper responsividade, secreção aumentada de muco e remodelamento do epitélio das vias aéreas, fatores importantes relacionados aos quadros sintomáticos subsequentes (Zhu et al. 1997, Papadopoulos et al. 2001).

Uma vez estabelecida infecção, a gravidade das manifestações clínicas é determinada por fatores ambientais, genéticos e intrínsecos ao patógeno. Idade, exposição prolongada ao agente etiológico, prematuridade, desnutrição, bem como função pulmonar constituem fatores de risco relacionados às infecções respiratórias virais (Okiro et al. 2008, Tregoning & Schwarze 2010). Destes, a reduzida idade é o fator mais bem caracterizado, uma vez que interfere na constituição física, tamanho do sítio anatômico, na dinâmica de transmissão viral e no estado precoce de desenvolvimento imunológico. Além disso, apresenta relação direta com as reservas energéticas do indivíduo, o que justifica a grande exaustão no ato de respirar e as altas taxas de mortalidade em decorrência desse fato (Tregoning & Schwarze 2010).

As infecções das vias aéreas são divididas em duas categorias, infecções do trato respiratório superior (ITRS) e inferior (ITRI), de acordo com o sítio anatômico em questão. As ITRS consistem em infecções da nasofaringe e mucosa nasal, podendo atingir laringe, tonsilas, óstios dos seios paranasais e tubária (Figura 1). Os sinais clínicos mais frequentemente observados são: resfriado comum, coriza, tosse, rinite e faringite. Em alguns casos ocorrem sinais de otite média e otalgia (Tregoning & Schwarze 2010). As infecções causadas pelos vírus Influenza são classificadas à parte por apresentarem sintomas sistêmicos característicos da gripe, como febre, mialgia, cefaleia e vômitos (Hançerli et al. 2010).

Por outro lado, as ITRI restringem-se à traqueia, brônquios, bronquíolos, e alvéolos, e consequentemente apresentam sintomatologia associada a quadros mais graves do que as ITRS (Bicer et al. 2013). Os sintomas presentes incluem dispneia e sibilância. Quadros de bronquite, bronquiolite, crupe e pneumonia também podem estar presentes (Tregoning & Schwarze 2010, Pavia 2011).



**Figura 1. Representação esquemática do trato respiratório humano. Adaptado de <http://www.iaquk.org.uk/ResourcesRespiratory.html>.**

Dentre os diversos vírus respiratórios descritos a maioria apresenta semelhança no padrão de manifestações clínicas resultante de infecções no TRS, porém, alguns se diferenciam com destaque para sintomas específicos de ITRIs (Quadro 1).

**Quadro 1. Sintomatologia das infecções das Vias Aéreas Inferiores e vírus respiratórios associados**

| Sintomas                              | Agente etiológico                      |
|---------------------------------------|----------------------------------------|
| Bronquite/Bronquiolite                | <b>RSV, hMPV, PIV, Adenovírus</b>      |
| Exacerbação de asma e chiado          | <b>RSV, hMPV, Rinovírus</b>            |
| Crupe                                 | <b>PIV</b>                             |
| Pneumonia                             | <b>FLU, PIV, Adenovírus, RSV, hMPV</b> |
| Pneumonia em Pacientes Transplantados | <b>RSV, PIV, FLU, hMPV</b>             |

(Adaptado de Pavia 2011).

Além dos quadros clínicos relacionados, estudos indicam que as infecções por vírus respiratórios também constituem a causa mais comum de exacerbação dos sintomas de doenças pulmonares crônicas preexistentes em crianças, como asma e doença pulmonar crônica obstrutiva (Johnston et al. 1995, Jackson & Johnston 2010, Althani et al. 2012, Matsumoto & Inoue 2014).

A liberação de diversos fatores pró-inflamatórios frente à exposição do epitélio do trato respiratório a agentes virais desencadeia três fenômenos essenciais no desenvolvimento e exacerbação de asma: recrutamento celular; hiper responsividade das vias aéreas e remodelamento tecidual (Matsumoto & Inoue 2014).

A presença em grande quantidade de mastócitos, eosinófilos, linfócitos, macrófagos e células dendríticas contribui com o estabelecimento do processo inflamatório. A produção de mediadores tanto por essas células quanto por células estruturais intensifica a resposta imune promovendo o estreitamento das vias aéreas (Hamid & Tulic 2009), o qual é caracterizado pela combinação de edema, infiltrado de células inflamatórias, secreção de muco, contração da musculatura lisa e descamação do epitélio. As mudanças estruturais são reversíveis na maioria dos casos, embora possam se tornar constantes com a progressão da doença (Papadopoulos et al. 2012). Alguns vírus em particular potenciam esse quadro através de mecanismos intrínsecos que favorecem perfis específicos de resposta imunológica. É o caso dos RSV, cujos baixos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 induzidos durante a infecção estimulam a formação de uma resposta do tipo Th2, relacionada com o desenvolvimento de asma (Matsumoto & Inoue 2014). A proteína G, secretada pelos RSV, pode também aumentar os níveis de IL-5 e IL-13 em modelos murinos, induzindo um maior recrutamento eosinofílico (Johnson et al. 2003).

## 1.4 Diagnóstico

Como referido, a distinção entre a gama de vírus respiratórios capazes de causar infecção no trato respiratório não é possível apenas pela avaliação clínica. Sendo assim, o diagnóstico específico baseia-se quase totalmente na investigação laboratorial (Lam et al. 2007).

O diagnóstico das infecções respiratórias por vírus teve início em 1933 com a descoberta do vírus Influenza A (Palese & Shaw 2007). Atualmente os métodos convencionais consistem em isolamento viral em cultura de células, detecção de antígenos, sorologia e imunofluorescência (direta e indireta) (Landry & Ferguson 2000, Mahony 2008, Bawage et al. 2013, Brasil 2014b). Dentre as amostras clínicas utilizadas, aspirado nasofaríngeo, lavado bronco-alveolar, swab da nasofaringe e orofaringe, não observa-se grande diferença quanto às taxas de detecção molecular (Jartti et al. 2013), embora de la Tabla et al. (2010) tenham sugerido que a combinação dos dois tipos de swab viria a conferir uma maior sensibilidade ao diagnóstico frente a amostra de escolha, o aspirado nasofaríngeo. Embora o aspirado seja utilizado na maioria dos estudos, eficácia semelhante de amostras provenientes de procedimentos não invasivos (swab) tem sido relatada, principalmente em estudos conduzidos em populações cuja coleta do aspirado é dificultada pela falta de equipamentos, profissionais capacitados, entre outros fatores (Blaschke et al. 2011).

O isolamento viral classicamente vem sendo realizado por cultivo celular em placa, utilizando diferentes linhagens celulares para cada vírus, a saber, células HeLa para adenovírus, células RD para enterovírus, LLC-MK2 para PIVs, RSV, hMPV e alguns HCoV e células MDCK2 para FLUA e B (Pyrce et al. 2012). Uma das limitações dessa técnica é a ausência de modelos para isolamento de vírus recentemente descritos, como alguns HCoV e HBoV (Mahony 2008, Pyrce et al. 2012).

Os imunoensaios, principalmente a imunofluorescência, são bem difundidos pela sua simplicidade, custo acessível e diversas opções no mercado. Consistem em metodologias baseadas na detecção de antígenos virais presentes em células provenientes de amostras clínicas. Isso é possível pela interação dos antígenos virais com anticorpos monoclonais associados a espécies químicas capazes de emitir fluorescência, sob excitação em determinados comprimentos de onda (Bawage et al. 2013). Os kits comerciais mais comuns abrangem sete vírus respiratórios, FLUA e B, PIV 1, 2 e 3, Adenovírus e RSV e o protocolo de reação provê resultados em um período médio de duas horas (Landry & Ferguson 2000). A técnica, apesar

de acessível, depende muito da qualidade dos espécimes clínicos coletados e da capacidade de interpretação dos profissionais responsáveis pelo ensaio (Mahony 2008, Bawage et al. 2013).

Com o advento da reação em cadeia pela polimerase (PCR) métodos moleculares se tornaram o padrão-ouro no diagnóstico das infecções respiratórias virais, por oferecerem rapidez, especificidade, sensibilidade e possibilidade de detecção de vírus fastidiosos.

Variações da PCR como a reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR), *Nested*-PCR, PCR-multiplex e PCR em tempo real (qPCR) permitem a detecção simultânea de vários agentes virais em uma única reação, detecção de mais de um vírus em um único paciente (co-deteção) e detecção em indivíduos assintomáticos (Arens et al. 2010, Ruuskanen et al. 2011, Brand et al. 2012). Em comparação aos métodos convencionais de detecção, como detecção de antígenos, os métodos baseados na amplificação de material genético por PCR e derivados apresentam sensibilidade e especificidade superiores, facilidade para automação, podem ser utilizados tanto para detectar quanto quantificar vírus presentes na amostra e por fim os produtos podem ser sequenciados permitindo a caracterização molecular das variantes virais (Jartti et al. 2013).

Além desses métodos estão disponíveis kits comerciais para detecção de vírus respiratórios baseados nas técnicas de RT-PCR e qPCR, com painéis abrangendo mais de 17 patógenos virais (Arens et al. 2010, Ali et al. 2011, Rand et al. 2011, Leekha et al. 2013).

Os painéis disponíveis no mercado são diversos e constantemente são revisados e atualizados, alcançando sensibilidades de 83 a 100% considerando como padrão de comparação a técnica de RT-qPCR separadamente para cada vírus (Deng et al. 2013). Diversos autores têm relatado a concordância de resultados de aproximadamente 80% entre diferentes plataformas de detecção, as quais apresentam eficiência variada de detecção em relação a alguns vírus em particular (Babady et al. 2012, Popowitch et al. 2013, Costa et al. 2015).

No Brasil, a sintomatologia grave e necessidade de hospitalização, denominada Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) é de notificação obrigatória. O protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde para vigilância epidemiológica de Influenza e outros vírus respiratórios (PIV 1 – 3, RSV, Adenovírus) baseia-se na detecção por imunofluorescência indireta, tendo como amostra preferencial o aspirado nasofaríngeo. Amostras provenientes de casos suspeitos de Influenza pandêmica, Influenza A (2009), são encaminhadas aos laboratórios de referência do país, onde a detecção diferencial por RT-PCR é realizada (Brasil 2014b).

## 1.5 Prevenção e Tratamento

Em decorrência do impacto das infecções respiratórias virais principalmente em populações de risco e dos constantes surtos de infecções em diversas regiões, recentemente medidas de controle de transmissão têm recebido maior atenção, como lavagem e higienização das mãos, cuja correta execução pode contribuir com redução de até 16% no risco de disseminação viral (Rabie & Curtis 2006). Outras medidas importantes são evitar contato com secreções nasais, uso de lenços descartáveis, evitar contato direto com indivíduos contaminados bem como locais públicos de superlotação quando estiver apresentando sintomatologia (Gould & Grey 2009).

De todas as medidas profiláticas, a vacinação continua sendo o método mais eficaz no controle das infecções virais. Dentre os vírus respiratórios, a única vacina disponível é do vírus Influenza, embora ensaios clínicos recentes tenham sugerido vacinas atenuadas contra o RSV combinadas com adjuvantes capazes de induzir respostas celulares do tipo  $T_H1$ , ainda inviáveis para uso na prática clínica (Meyer et al. 2008). Outras formulações consistem na aplicação nasal e intramuscular de subunidades da proteína de Fusão dos RSV, em conjunto com agonistas TLR e outros adjuvantes. Estudos em modelos murinos provaram a capacidade da formulação em estimular respostas imunes eficazes e balanceadas, sem sinais posteriores de imunopatologia, ressaltando a eficácia desse possível candidato a vacina em humanos (Garlapati et al. 2012).

Segundo recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o hemisfério sul, a vacina sazonal de subunidades do vírus influenza distribuída no ano de 2014 foi constituída de três variantes virais, FLUA H1N1 pdm09, FLUA H3N2 e FLUB, administrada em duas doses com quatro semanas de diferenças para crianças na faixa etária de um a oito anos e em uma dose para indivíduos acima de nove anos de idade (Carvalho et al. 2013, Brasil 2014a). Atualmente no Brasil, a vacina é distribuída pelo Ministério da Saúde gratuitamente para gestantes, adultos com idade maior do que 60 anos, crianças com idade menor que dois anos, profissionais da área da saúde, imunodeprimidos e indivíduos portadores de doenças crônicas, como asma, diabetes, obesidade, cardiopatias e Síndrome de Down (Brasil 2014a). Outras vacinas vêm sendo desenvolvidas em centros brasileiros de pesquisa com resultados satisfatórios, como a vacina monovalente FLUA H5N1 de vírus inteiros inativados e de subunidades (Miyaki et al. 2010).

Estão disponíveis, ainda, fármacos antivirais cujo uso no tratamento das infecções respiratórias é bastante disseminado, como os inibidores da Neuraminidase - Oseltamivir e Zanamivir, indicados principalmente para crianças de um a cinco anos de idade portadores de

doenças pulmonares crônicas com alto risco de desenvolverem síndrome respiratória severa em decorrência da infecção pelos vírus Influenza. Os análogos de nucleosídeos, como a Ribavirina, também mostram resultados antivirais consideráveis no controle das infecções por RSV. Contudo, seu uso não é muito comum em decorrência de seus efeitos colaterais teratogênicos e por não prover bom prognóstico, uma vez que os danos inflamatórios nas infecções por RSV não são causados exclusivamente pela presença do vírus em replicação (Tregoning & Schwarze 2010).

Amantadina e Rimantadina, pertencentes ao grupo de fármacos inibidores da proteína viral M2, também têm sido utilizados como profilaxia contra a infecção por FLU. Desses, apenas o primeiro apresentou resultados satisfatórios (Jefferson et al. 2006). Aproximadamente em cada nove crianças tratadas com Amantadina, um caso de infecção por FLU foi prevenido, embora a segurança do uso do fármaco ainda não esteja bem estabelecida (Galvão et al. 2014).

## **1.6 Epidemiologia**

Estima-se que infecções do trato respiratório e doenças respiratórias crônicas são responsáveis por cerca de quatro milhões de óbitos ao ano mundialmente, sendo que em países em desenvolvimento as taxas tendem a ser maiores (WHO 2008). A grande maioria dessas infecções são causadas por vírus respiratórios (Huijskens et al. 2012), indicando que a circulação desses patógenos não é restrita a determinadas regiões do globo.

A incidência dos vírus respiratórios está intimamente ligada aos métodos de transmissão viral, influenciados por fatores climáticos e geográficos. Em climas temperados os padrões sazonais de circulação viral respondem muito ao fator temperatura (Yusuf et al. 2007), enquanto em climas tropicais outros fatores estão envolvidos, como precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar, tornando a sazonalidade das infecções mais complexa de ser analisada (Lofgren et al. 2007).

Khor et al. (2012) investigaram crianças hospitalizadas com doença respiratória aguda na Malásia encontrando prevalência global da infecção por pelo menos um vírus de 26,4%. Dentre os vírus detectados, RSV foi o de maior prevalência, seguido pelos PIVs, FLUA e B e Adenovírus (70,6%; 13,2%; 11% e 5,2% respectivamente). O perfil sazonal mais bem definido foi o das infecções por RSV, que teve picos em meses do ano de alta precipitação pluviométrica e baixas temperaturas.

Em estudo realizado na China, entre 2009 e 2010, 720 amostras clínicas de swab da oro e nasofaringe bem como lavado broncoalveolar provenientes de crianças apresentando

IVAS e/ou IVAI foram testadas para os principais vírus respiratórios, Adenovírus, HBoV, HCoV, hMPV, FLU, RSV, PIV, Enterovírus e Rinovírus. Destas, 55,83% apresentaram positividade para pelo menos um dos vírus pesquisados. Os vírus mais prevalentes foram os Rinovírus (19,72%), PIV (17,78%) e FLU (13,9%). As infecções por FLU apresentaram pico de incidência em meses de outono e inverno; por PIV apresentaram maior incidência nos meses de verão e outono; por Enterovírus nos meses de verão; por RSV nos meses de inverno e primavera e as infecções por HBoV apresentaram pequenos picos de incidência durante o inverno e primavera. Os demais vírus não apresentaram perfis sazonais bem definidos (Lu et al. 2013).

Tan et al. (2014) em Cingapura, reportaram índice de detecção viral de 49%. O estudo conduzido durante um período de três anos abrangeu militares apresentando sintomas de ITR com idade média de 20 anos. A variante FLUA pandêmica de 2009 foi a mais detectada, em 13,4% das amostras coletadas que apresentaram apenas um vírus, seguida por FLUB (12,9%), Coxsackevirus (9%) e Rinovírus (7,5%) (Tan et al. 2014).

Índice de infecção mais elevado foi encontrado por Huijskens et al. 2012, em crianças sintomáticas na Holanda. Em 130 das amostras analisadas foi detectado pelo menos um vírus (73,4%). RSV foi detectado em 36,6% das amostras, seguido por Rinovírus e Enterovírus, detectados em 24,1 e 8,5% respectivamente (Huijskens et al. 2012).

Outro estudo realizado no Quênia em dois campos de refugiados onde a maioria das amostras coletadas adveio de pacientes pediátricos, a prevalência global da infecção por vírus respiratórios foi de 49,8%. Dos vírus identificados, os mais frequentes foram os Adenovírus (21,7%), RSV (12,5%), hMPV (5,7%) e PIV (9,4%) (Ahmed et al. 2012).

No Brasil, os índices de detecção viral relacionados aos quadros de ITRS e ITRI variam de 17,29% a 85,5% em população pediátrica (Bezerra et al. 2011, Freitas et al. 2013, Arruda et al. 2014). Índices de 50 a 60% foram encontrados em pacientes adultos e jovens apresentando sintomas respiratórios agudos sob quimioterapia e após receberem dose controle da vacina sazonal de Influenza, respectivamente (Carvalho et al. 2013, Benites et al. 2014).

Estudo recente realizado por Albuquerque et al. (2012) em crianças apresentando ITRS e ITRI no estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 2006 e 2007, relatou índice de prevalência das infecções respiratórias virais de 31,2%. Os vírus mais prevalentes foram os Rinovírus, FLUA, hMPV, HBoV e RSV. A maioria das infecções foram detectadas nos meses de junho e novembro, correspondendo ao final do outono, inverno e primavera (Albuquerque et al. 2012).

O Quadro 2 apresenta um levantamento de estudos conduzidos em populações pediátrica e adulta, sendo evidenciada uma relevante divergência com relação à frequência

relativa dos vírus respiratórios. A grande variedade de metodologias de diagnóstico e detecção viral, bem como a falta de padronização no desenho dos estudos podem ser fatores que contribuem com essa discrepância, embora a localização geográfica não possa ser descartada como outro possível fator contribuinte.

**Quadro 2. Detecção viral em amostras respiratórias – Levantamento bibliográfico**

| <b>Autor, Ano, País</b>           | <b>N amostral</b> | <b>Idade</b>     | <b>Método de coleta de amostras</b> | <b>Metodologia de detecção</b> | <b>Índice global de detecção</b> | <b>Vírus mais frequentemente encontrados</b>           | <b>Índice de co-deteção</b> |
|-----------------------------------|-------------------|------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Bicer et al. 2013, Turquia        | 155               | <9 anos          | Aspirado nasofaríngeo               | Multiplex RT-PCR               | 66,50%                           | RSV (32%); Adeno (26,2%); PIV1-4 (19,4%); Rino (18,4%) | 21/155                      |
| Schnell et al. 2014, França       | 70                | média de 62 anos | Aspirado nasofaríngeo               | Multiplex PCR comercial        | 49,00%                           | FLUA (32,3%); Rino (17,6%)                             | 2/70                        |
| Tanner et al. 2012, Reino Unido   | 2326              | <5 anos          | Aspirado nasofaríngeo; Swab nasal   | qPCR                           | 65,20%                           | RSV (47,4%); Rino (30,6%); Adeno (13,9%)               | 349/2326                    |
| Culebras et al. 2013, Espanha     | 281               | <15 anos         | Aspirado nasofaríngeo               | Multiplex PCR comercial        | 80%                              | RSV A (29,2%); HBoV (15%); Entero (9,6%); Rino (9,25%) | 94/281                      |
| Althani et al. 2012, Qatar        | 200               | >18 anos         | Swab nasal                          | qPCR                           | 18%                              | Rino (36%); HCoV (31%)                                 | -                           |
| Olenec et al. 2010, Coréia do Sul | 58                | média de 6 anos  | Secreção nasal                      | Multiplex PCR comercial        | 50%                              | Rino (40%)                                             | -                           |
| Khetsuriani et al. 2006, EUA      | 142               | 2 - 5 anos       | Swab nasal                          | Multiplex RT-PCR; qPCR         | 41,50%                           | Rino (37,3%); hMPV (3,5 %); Entero (2,1%)              | 4/142                       |
| Ozcan et al. 2011, Turquia        | 104               | 3 - 17 anos      | Swab nasal                          | Multiplex PCR comercial        | 46,60%                           | Rino (28,8%); PIV 1 - 4 (7,7%); RSV (6,7%)             | 9/104                       |

| Autor, Ano, País                     | N amostral | Idade            | Método de coleta de amostras      | Metodologia de detecção        | Índice global de detecção                               | Vírus mais frequentemente encontrados                  | Índice de co-deteção |
|--------------------------------------|------------|------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------|
| Wark et al. 2013, Austrália          | 235        | média de 47 anos | Swab nasal                        | qPCR                           | 35,30%                                                  | Rino (40%)                                             | 9/235                |
| Khor et al. 2012, Malásia            | 12977      | <5 anos          | Aspirado nasofaríngeo; Swab nasal | IFI; Cultivo celular           | 26,40%                                                  | RSV (70,6%); PIV 1 - 4 (13,2%); FLUA (11%)             | 26/12977             |
| Dierig et al. 2014, Austrália        | 381        | <3 anos          | Swab nasal                        | Multiplex qPCR                 | 25,70%                                                  | Rino (39%); Adeno (39%)                                | -                    |
| Lu et al. 2013, China                | 720        | <14 anos         | Lavado broncoalveolar; Swab nasal | Multiplex <i>nested</i> RT-PCR | 55,80%                                                  | Rino (19,7%); PIV (17,7%); FLU (13,9%)                 | 99/720               |
| Amin et al. 2013, Egito              | 130        | 2 - 12 anos      | Swab nasal                        | qPCR                           | 41,50%                                                  | RSV (51,9%); hMPV (25,9%)                              | 0/130                |
| Thavagnanam et al. 2010, Reino Unido | 55         | 1 – 14 anos      | Lavado broncoalveolar             | Multiplex <i>nested</i> RT-PCR | 35%                                                     | Adeno (47,3%); RSV (26,3%); Rino (15,7%)               | -                    |
| Kwon et al. 2014, Coreia do Sul      | 309        | <6 anos          | Swab nasal                        | Multiplex <i>nested</i> RT-PCR | *Todas as amostras foram previamente testadas positivas | RSV (34,9%); hMPV (22,6%); Rino (14,6%); Adeno (12,3%) | -                    |
| Bezerra et al. 2011, Brasil          | 407        | <5 anos          | Aspirado nasofaríngeo             | Multiplex qPCR                 | 85,50%                                                  | RSV (37,3%); Adeno (24,8%); Rino (18,9%); HBoV (18,7%) | 161/407              |

| Autor, Ano, País                                                                                                                                                                                                                                        | N amostral | Idade    | Método de coleta de amostras | Metodologia de detecção | Índice global de detecção | Vírus mais frequentemente encontrados   | Índice de co-deteção |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------|------------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|----------------------|
| Gardinassi et al. 2012, Brasil                                                                                                                                                                                                                          | 272        | <6 anos  | Aspirado nasofaríngeo        | Multiplex RT-PCR        | 54,00%                    | RSV (29%); Rino (23,1%)                 | -                    |
| Albuquerque et al. 2012, Brasil                                                                                                                                                                                                                         | 205        | <15 anos | Swab nasal                   | Multiplex RT-PCR; qPCR  | 31,20%                    | Rino (51,5%); FLUA; hMPV; HBoV (7,8%)   | 8/205                |
| Benites et al. 2014, Brasil                                                                                                                                                                                                                             | 104        | <21 anos | Aspirado nasofaríngeo        | qPCR                    | 48%                       | Rino (23,1%); RSV (8,7%); HcoV (6,8%)   | 21/104               |
| Arruda et al. 2014, Brasil                                                                                                                                                                                                                              | 303        | <2 anos  | Aspirado nasofaríngeo        | qPCR                    | 78,9%                     | RSV (33,1%); Rino (29,4%); HBoV (19,2%) | -                    |
| IFI, Imunofluorescência Indireta; FLU, Vírus Influenza; RSV, Vírus Sincicial Respiratório; PIV, Vírus Parainfluenza; Rino, Rinovírus; Entero, Enterovírus; HcoV, Coronavírus; hMPV, Metapneumovírus humanos; Adeno, Adenovírus; HBoV, Bocavírus humanos |            |          |                              |                         |                           |                                         |                      |

### 1.6.1 Infecções virais e Exacerbações Asmáticas

Como citado anteriormente, as infecções virais constituem um fator relacionado com o agravamento da sintomatologia asmática, em episódios conhecidos como exacerbações. (Sandrock & Norris 2015). Essa relação pode ser evidenciada nos poucos estudos de investigação já realizados comparando crianças asmáticas apresentando exacerbação dos sintomas com grupos controle, geralmente constituídos por crianças asmáticas estáveis (sem agravamento dos sintomas) (Khetsuriani et al. 2006, Mandelcwajg et al. 2010, Ozcan et al. 2011, Leung et al. 2013, Teeratakulpisarn et al. 2014).

Nesse cenário, a presença de vírus tem sido detectada em 50% ( $p < 0.001$ , IC 95%) a 53,8 ( $p = 0.012$ , IC 95%) dos casos de exacerbação asmática em comparação com grupos controle. Os vírus mais frequentemente detectados, em concordância com estudos conduzidos em crianças com ITR, são os Rinovírus, presentes em 26,2 ( $p = 0.018$ , IC 95%) a 35,6% ( $p = 0.002$ , IC 95%) das exacerbações asmáticas, seguidos dos RSV (6,7%) e hMPV (5,8%), dados de estudos conduzidos na Turquia e em Hong Kong, respectivamente (Ozcan et al. 2011, Leung et al. 2013).

A gravidade dos sintomas durante a crise de exacerbação asmática também demonstra significância com a presença de pelo menos um vírus nas amostras clínicas, o que foi evidenciado por Amin et al. (2013). Dos pacientes apresentando crises moderadas ou severas, 29,6% ( $p < 0.001$ , IC 95%) tiveram pelo menos um vírus detectado em seus espécimes clínicos (Amin et al. 2013).

No Brasil até o momento não existem estudos específicos que visaram a detecção de vírus respiratórios e sua relação com quadros de exacerbação asmática, sendo que a grande maioria dos estudos têm como foco hospitalizações por doença respiratória aguda, bem como uma abordagem clínico-epidemiológica (Thomazelli et al. 2007, Carvalho et al. 2013, de-Paris et al. 2014). Na região Centro-Oeste estudo recente conduzido pelo nosso grupo de pesquisa não observou diferenças estatísticas entre o grupo de asmáticos exacerbados e não exacerbados após a triagem das amostras por Imunofluorescência indireta (IFI). Ressalta-se ainda a detecção de Rinovírus em significativa parcela das amostras (Costa 2014). Além desse estudo, os únicos dados disponíveis sobre incidência das infecções respiratórias na região se resumem aos boletins epidemiológicos sobre *Influenza* e SRAG disponibilizados pelo Ministério da Saúde (Brasil 2013).

## 2 JUSTIFICATIVA

---

Mundialmente, infecções agudas do trato respiratório (ITRs) representam importante causa de morbidade e mortalidade entre crianças. Embora possam ser associadas a bactérias e fungos, os vírus constituem os principais agentes etiológicos responsáveis por essas infecções. (Barker et al. 2001, Boone & Gerba 2007, Van Der Zalm et al. 2009, Ruuskanen et al. 2011). Os vírus respiratórios têm sido descritos como a causa mais frequente de exacerbação de sintomas entre pacientes apresentando doença pulmonar crônica obstrutiva e asma, com destaque para as infecções por rinovírus (Johnston et al. 1995, Althani et al. 2012, Kurai et al. 2013).

Asma é a condição clínica respiratória crônica mais frequente em crianças. Estimativas apontam que cerca de 300 milhões de pessoas sejam afetadas pela asma em todo mundo, com a observação do aumento de sua prevalência nos últimos anos (Dougherty & Fahy 2009). Apesar dos avanços na padronização de medicamentos direcionados ao tratamento e ainda, o desenvolvimento de programas de controle da asma (Stirbulov et al. 2006) a ocorrência de quadros de exacerbações respiratórias agudas têm constituído a principal causa de morbidade e mortalidade associada à asma (Dougherty & Fahy 2009).

Considerando a população pediátrica, dados sobre a incidência das infecções virais além de seu impacto nos casos de exacerbação asmática são escassos no Brasil e principalmente na região Centro-Oeste, sendo que a grande maioria dos estudos têm como foco hospitalizações por doença respiratória aguda, bem como uma abordagem clínico-epidemiológica (Thomazelli et al. 2007, Carvalho et al. 2013, de-Paris et al. 2014). Sendo assim, é de essencial importância a avaliação de episódios de asma com exacerbação de sintomas ou não e a associação destes quadros com infecção por vírus respiratórios, considerando diferentes aspectos como epidemiologia, prevalência e sazonalidade.

Diante do exposto, a presente proposta tem a perspectiva de agregar conhecimentos no contexto da asma e das infecções do trato respiratório em população pediátrica, considerando a presença de vírus, visando obter uma melhor compreensão do papel destes agentes e ainda, fornecer subsídios que auxiliem no aperfeiçoamento de medidas preventivas ou associadas ao tratamento.

### **3 OBJETIVOS**

---

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Investigar a ocorrência de vírus respiratórios em população pediátrica na cidade de Goiânia - Goiás: crianças com quadro de infecção do trato respiratório e crianças asmáticas (exacerbadas ou assintomáticas).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar o índice de positividade para vírus respiratórios na população estudada;
- Identificar a ocorrência de co-deteção viral nas amostras avaliadas;
- Analisar o índice de positividade para cada vírus em relação aos grupos populacionais estudados;
- Relacionar a positividade viral à presença de sintomas das crianças;
- Avaliar o perfil de circulação dos vírus respiratórios identificados.

## **4 METODOLOGIA**

---

### **4.1 Delineamento e População de Estudo**

A presente investigação consistiu de estudo de corte transversal, com coleta de dados realizada no período de agosto de 2012 a agosto de 2013. A população de estudo consistiu de crianças com idade entre quatro a 14 anos, atendidas em dois hospitais públicos, um hospital privado e duas unidades de pronto-atendimento da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia - Goiás. O limite inferior de idade foi definido na tentativa de evitar a inclusão de crianças com sibilância de outra causa, não asma, comum nos primeiros três anos de idade, enquanto o limite superior foi definido por se tratar da idade máxima limite para atendimento pediátrico em unidades públicas de saúde.

Como critério de inclusão, foram consideradas as crianças apresentando sintomas que permitissem a classificação em uma das três categorias: asmáticos exacerbados (AE), asmáticos não exacerbados (ANE) e não asmáticos com sintomas de infecção do trato respiratório (ITR). Para esta classificação, asma foi definida como mais de dois episódios prévios de sibilância, dispneia com resposta clínica a broncodilatadores ou diagnosticada por médico não relacionado ao estudo e a exacerbação como um episódio agudo que levou à busca do atendimento de urgência com ou sem necessidade de internação. Foram considerados sintomas de infecção do trato respiratório a presença de dois ou mais sintomas (febre, coriza, dor de garganta ou tosse) nas 48 horas anteriores à consulta, com duração inferior a cinco dias. Foram excluídos pacientes portadores de doenças respiratórias de base (fibrose cística, bronquiectasias), outras doenças crônicas como diabetes, imunodeficiência, insuficiência renal, encefalopatia crônica e doenças metabólicas.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, protocolo 175/2011.

### **4.2 Coleta de dados e amostras**

O recrutamento dos pacientes foi realizado nas unidades de saúde, por membros da equipe de pesquisadores envolvidos na pesquisa. Os pacientes e seus responsáveis foram esclarecidos sobre os objetivos e metodologia do estudo. Em seguida, em caso de consentimento dos pais ou responsáveis pela criança, foi feita a assinatura do Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 1) pelo mesmo, seguida de preenchimento do questionário (Anexo 2).

Posteriormente, foram coletados Aspirados Nasofaríngeos (ANF) e/ou swab nasal em casos de impossibilidade de coleta do ANF, seguindo recomendações do Ministério da Saúde (Brasil 2010).

Após a coleta todos os espécimes clínicos foram acrescidos de 1,5 mL de meio de transporte (Meio essencial mínimo – MEM, Gibco) e encaminhados ao Laboratório de Virologia Humana – IPTSP/UFG, onde foram armazenados em freezer a -20 °C e processados dentro de um prazo máximo de quatro horas.

#### **4.3 Preparo das Amostras Clínicas**

Inicialmente os ANF e swabs nasais foram processados para obtenção de uma solução homogênea sem células em Meio Essencial Mínimo (MEM). De forma resumida, o espécime clínico foi diluído em 3mL de MEM, homogeneizado e centrifugado à 1200 rpm, -4°C por dez minutos. Os sobrenadantes foram separados do sedimento celular e devidamente armazenados em freezer a -80°C até a realização dos ensaios moleculares.

#### **4.4 Extração do Material Genético**

O material genético viral foi extraído a partir de 200 µL do fluído proveniente das amostras clínicas processadas, utilizando kit comercial de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante (QIAamp cador pathogen Mini Kit, QIAGEN, Alemanha).

Brevemente, as amostras foram tratadas com proteinase K e RNA carreador, seguido de homogeneização em vórtex. Adicionou-se tampão de lise às amostras e após nova etapa de homogeneização o lisado foi transferido para mini-colunas de eluição fornecidas pelo kit. Seguiu-se duas etapas de lavagem com tampões específicos e ao final do processo foi obtido um concentrado de 150 µL por amostra extraída, sendo armazenado imediatamente em freezer a -80 °C até a realização dos ensaios moleculares.

O procedimento foi realizado de forma a evitar possíveis contaminações e, para cada dez amostras extraídas foi adicionado um tubo contendo o controle negativo (água MiliQ), o que persistiu em todas as etapas subsequentes.

## 4.5 Triagem molecular

### 4.5.1 Transcrição Reversa

Do produto de extração, 20 µL foram submetidos à reação de transcrição reversa objetivando converter em cDNA o RNA genômico dos vírus a serem pesquisados. Para tanto, foi utilizado Iniciador Randômico (PdN6- *Invitrogen*<sup>®</sup> life technologies, Foster City, Califórnia, EUA), água DEPC, 1 mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), 1 mM de cloreto de magnésio, 10U da enzima transcriptase reversa (MMLV - *Invitrogen*<sup>®</sup> life technologies, Foster City, Califórnia, EUA), tampão 10X –MgCl<sub>2</sub> e 24U de enzima inibidora de RNase (RNaseOUT – *Invitrogen*, Foster City, Califórnia, EUA) para a preparação da mistura de reação em um volume final de 50 µL. A ciclagem utilizada (Mastercycler Personal/Eppendorf) consistiu de um único ciclo nas temperaturas de 25°C, por 5 minutos; 42°C, por 10 minutos; 50°C, por 20 minutos e 85°C, por 5 minutos.

### 4.5.2 Reação em cadeia pela polimerase

Foi proposta a elaboração de três reações de multiplex *nested*-PCR para a detecção de 16 vírus respiratórios (FLU A, B e C, RSV A e B, PIV 1 – 4, HCoV-229E, HCoV-OC43, Rinovírus, Enterovírus, Adenovírus, HBoV e hMPV). Para isso, a partir de iniciadores descritos por Coiras e cols. (2003, 2004), López-Huertas e cols. (2005), Pozo e cols. (2007), Allard e cols. (1992), Puig e cols. (1994), foram construídos diferentes protocolos.

Foram consideradas regiões-alvo classicamente utilizadas por metodologias de detecção molecular baseadas na PCR, por seu relativo grau de conservação e capacidade de diferenciação entre diferentes vírus de uma mesma família. Além disso, para a escolha dos iniciadores levou-se em conta a diferença de tamanho entre os fragmentos gerados e sua disposição na corrida eletroforética.

Após extensa etapa de padronização e testes, estabeleceram-se três reações de multiplex distintas, de forma que cada espécime clínico teve de ser submetido a três reações diferentes: MVR1 (FLU A, B e C, RSV A e B); MVR2 (PIV 1 – 4, HCoV 229E e OC43, Rinovírus e Enterovírus); MVR3 (Adenovírus, HBoV e hMPV). Para as etapas de padronização, foram utilizadas amostras controle positivas e água MilliQ como controle negativo. Amostras com resultado positivo foram triadas novamente por monoplex para confirmação, utilizando-se iniciadores específicos para o(s) vírus detectado(s). Após a

definição dos três protocolos foram escolhidas amostras representativas de cada vírus detectado para serem submetidas ao sequenciamento dos fragmentos amplificados.

*PCRMVR1 – Primeira amplificação.* A 5 µL de cDNA previamente sintetizado foram adicionados Tampão 10X (-MgCl<sub>2</sub>), 3mM de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs a 0,1 mM cada, 0,4 mM dos iniciadores específicos (Tabela 2), 1,5U da enzima TaqDNA polimerase (TaqDNA Polymerase, recombinant - Invitrogen, Foster City, Califórnia, EUA) e água MiliQ, completando um volume final de 50 µL. A ciclagem utilizada no termociclador consistiu de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por dois minutos, 45 ciclos de desnaturação (94°C, 30 segundos), anelamento (50°C, dois minutos) e extensão (68°C, um minuto), por fim extensão final a 68°C por 10 minutos.

*Segunda amplificação.* Para a *Nested* foram utilizados 4 µL do produto da primeira amplificação e os mesmos reagentes utilizados na primeira etapa, nas mesmas concentrações diferindo apenas no conjunto de iniciadores utilizados (Tabela 1) e na concentração da enzima TaqDNA polimerase, 5 U por reação. A ciclagem utilizada foi a seguinte: etapa de desnaturação inicial a 95°C por quatro minutos, 35 ciclos de desnaturação (94°C, 30 segundos), anelamento (55°C, um minuto) e extensão (72°C, 30 segundos), seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos.

**Tabela 1. Sequência dos Iniciadores utilizados na reação PCRMVR1**

| PCRMVR1 |                                  |             |                                     |
|---------|----------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| Nome    | Sequência 5' - 3'                | Região alvo | Fragmento (pb)                      |
| FluAC1  | GAACTCRTYCYWWATSWCAAWGRRGAAAT    | NP          |                                     |
| FluB1   | ACAGAGATAAAGAAGAGCGTCTACAA       | NP          |                                     |
| FluABC2 | ATKGCWCYRAYAMWCTYARRTCTTCAWAIGC  | NP          |                                     |
| RSVAB1  | ATGGAGYTGCRYATCCWCARRRCAARTGCAAT | F           |                                     |
| RSVAB2  | AGGTGTWGTACACCTGCATTRACACTRAATTC |             |                                     |
|         |                                  |             |                                     |
| Nested  |                                  |             |                                     |
| FluAB3  | GATCAAGTGAKMGRRAGYMGRAAYCCAGG    | NP          | 301(FLUA)<br>226(FLUB)<br>111(FLUC) |
| FluC3   | AAATTGGAATTTGTTCTTTCAAGGGACA     | NP          |                                     |
| FluAC4  | TCTTCAWATGCARSWSMAWKGCATGCCATC   | NP          |                                     |
| FluB4   | CTTAATATGGAAACAGGTGTTGCCATATT    | NP          |                                     |
| RSVA3   | TTATACACTCAACAATRCCAAAAWACC      | F           | 363(RSVA)                           |
| RSVA4   | AAATTCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGT     | F           |                                     |
| RSVB3   | ATCTTCCTAACTCTTGCTRTTAATGCATTG   | F           | 611(RSVB)                           |
| RSVB4   | GATGCGACAGCTCTGTTGATTTACTATG     | F           |                                     |

**PCRMVR2 – Primeira amplificação.** Para a reação foram utilizados 4 µL do cDNA sintetizado, água MiliQ, 0,16 mM de cada iniciador (Tabela 2), e mix comercial para PCR (GoTaq Colorless Master Mix – Promegacorporation, Madison, Wisconsin, EUA - 50 U/mL de Taq DNA polimerase, Tampão de reação - pH 8,5, 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP e 3mM MgCl<sub>2</sub>), para um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, 45 ciclos de desnaturação (94°C, 30 segundos), anelamento (55°C, um minuto e 30 segundos) e extensão (72°C, um minuto), seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos.

**Segunda amplificação.** Partindo de 2 µL do produto da primeira amplificação foram adicionados os mesmos reagentes da primeira, alterando-se apenas o conjunto de iniciadores (Tabela 2) e a concentração dos mesmos, a 0,2 mM. Os ciclos para a reação foram os mesmos citados na segunda amplificação do primeiro grupo (PCRMVR1).

**Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados na reação PCRMVR2**

| <b>PCRMVR2</b> |                                |                    |                                                  |
|----------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Nome</b>    | <b>Sequência 5' - 3'</b>       | <b>Região alvo</b> | <b>Fragmento (pb)</b>                            |
| 1-PIV13        | AGGWTGYSMRGATATAGGRAARTCATA    | HN                 |                                                  |
| 2-PIV13        | CTWGTATATATRTAGATCTTKTTRCCTAGT | HN                 |                                                  |
| 1-PIV2         | TAATTCCTCTTAAAATTGACAGTATCGA   | HN                 |                                                  |
| 1-PIV4         | ATCCAGARRGACGTCACATCAACTCAT    | 5'NCR-HN           |                                                  |
| 2-PIV24        | TRAGRCCMCCATAYAMRGGAATA        | HN                 |                                                  |
| 1-HcoV         | TGTGCCATAGARGAYWTACTTTTT       | S                  |                                                  |
| 2-HcoV         | AACCGCTTKYACCAKCAAYGCACA       | S                  |                                                  |
| 1-EV/RV        | CTCCGGCCCCCTGAATRYGGCTAA       | 5'NCR-VP4/VP2      |                                                  |
| 2-EV/RV        | TCIGGIARYTTCCASYACCAICC        | 5'NCR-VP4/VP2      |                                                  |
| <b>Nested</b>  |                                |                    |                                                  |
| 3-PIV13        | ACGACAAYAGGAARTCATGYTCT        | HN                 | 439(PIV1)<br>390(PIV3)<br>297(PIV2)<br>174(PIV4) |
| 4-PIV1         | GACAACAATCTTTGGCCTATCAGATA     | HN                 |                                                  |
| 4-PIV3         | GAGTTGACCATCCTYCTRTCTGAAAAC    | HN                 |                                                  |
| 3-PIV24        | CYMAYGGRTGYAYTMGAATWCCATCATT   | HN                 |                                                  |
| 4-PIV2         | GCTAGATCAGTTGTGGCATAATCT       | HN                 |                                                  |
| 4-PIV4         | TGACTATRCTCGACYTTRAAATAAGG     | HN                 | 630(229E)<br>587(OC43)                           |
| 3-HcoV         | TTGTGCGCAATGTTATAAWGGYAT       | S                  |                                                  |
| 4-HcoV         | GATAATRTGAGTRCCATTWCCACA       | S                  | 226(Enter)<br>110 (Rino)                         |
| 3-EV/RV        | ACCRSTACTTTGGGTRWCCGTG         | 5'NCR-VP4/VP2      |                                                  |
| 4-EV/RV        | CTGTGTTGAWACYTGAGCICCCA        | 5'NCR-VP4/VP2      |                                                  |

*PCRMVR3 – Primeira amplificação.* Para um volume final de 25 µL foram utilizados 2,5 µL do cDNA sintetizado, água MiliQ, 0,2 mM de cada iniciador específico (Tabela 3) e mix comercial GoTaq (GoTaq Colorless Master Mix – Promegacorporation, Madison, Wisconsin, EUA - 50 U/mL de Taq DNA polimerase, Tampão de reação - pH 8.5, 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP e 3mM MgCl<sub>2</sub>). A amplificação ocorreu sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C, por três minutos, 40 ciclos de desnaturação (94°C, 30 segundos), anelamento (53°C, um minuto), extensão (72°C, 40 segundos) e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

*Segunda amplificação.* As condições da *Nested* foram as mesmas da reação anterior, exceto os iniciadores (Tabela 3) e a quantidade de material inicial (2 µL do produto da primeira amplificação). A ciclagem utilizada no termociclador foi a seguinte: desnaturação inicial a 94°C, 30 ciclos de desnaturação (94°C, três minutos), anelamento (55°C, um minuto), extensão (72°C, 40 segundos) e a etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

**Tabela 3. Sequência dos Iniciadores utilizados na reação PCRMVR3**

| <b>PCRMVR3</b> |                               |                    |                       |
|----------------|-------------------------------|--------------------|-----------------------|
| <b>Nome</b>    | <b>Sequência 5' - 3'</b>      | <b>Região alvo</b> | <b>Fragmento (pb)</b> |
| MIS            | GAGTCCTACCTAGTAGACAC          | Matriz             |                       |
| MIA            | TTGTYCCTTGRTGRCTCCA           | Matriz             |                       |
| HBOV1f         | CACAGGAGCMGGAGYCGCAG          | NP-1/VP1/VP2       |                       |
| HBOV1r         | CCAAGATATYTRTATCCAGG          | NP-1/VP1/VP2       |                       |
| hexAA1885      | GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC     | Héxon              |                       |
| hexAA1913      | CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT       | Héxon              |                       |
| <b>Nested</b>  |                               |                    |                       |
| MIS            |                               | Matriz             | 718 (hMPV)            |
| M2A            | TCTTGCAKATYYTRCTKATGCT        | Matriz             |                       |
| HBOV2f         | GTGGTGTGGGTCTACTGGC           | NP-1/VP1/VP2       | 243 (HBoV)            |
| HBOV2r         | CTACGGTACACATCATCCCAG         | NP-1/VP1/VP2       |                       |
| nexAA1893      | GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG      | Héxon              | 142 (Adeno)           |
| nexAA1905      | TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC | Héxon              |                       |

#### 4.5.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação (9 µL), bem como o padrão de peso molecular 100bp DNA ladder (Invitrogen™/Life Technologies) foram misturados a 1µL do tampão de corante

da amostra (Azul de bromofenol; Xilenocianol; Glicerol) e aplicados em gel de agarose (Invitrogen™/Life Technologies) a 2 %, contendo 0,5mg/mL de brometo de etídeo e submetido a eletroforese em tampão TBE 0,5X (Tris/Borato/EDTA). Posteriormente, o gel foi examinado em transluminador ultravioleta para a visualização dos fragmentos de DNA de tamanho esperado (Tabelas 1, 2 e 3).

#### **4.6 Análise Estatística**

A avaliação das diferenças entre as variáveis e grupos foi realizada utilizando o teste  $\chi^2$  ou exato de Fisher, quando necessário, com intervalo de confiança de 95%. As análises foram realizadas utilizando os programas Epi Info versão 7 e IBM SPSS Statistics, versão 20.

## 5 RESULTADOS

Durante o período compreendido entre agosto de 2012 e agosto de 2013, 265 amostras clínicas foram coletadas em dois hospitais públicos, um hospital privado e duas unidades de pronto-atendimento da secretaria municipal de saúde da cidade de Goiânia – Goiás. Do total de amostras, 40 foram removidas do estudo por insuficiência de material clínico ou inconsistência de dados do questionário e assim, o material consistiu de 193 amostras de ANF e 32 de swab nasal.

**Tabela 4. Características da população e índice de positividade viral nas amostras pesquisadas**

|                                      | N (%)      | Infecção viral<br>Pelo menos um vírus / Total (%) | P      |
|--------------------------------------|------------|---------------------------------------------------|--------|
| <b>Idade</b>                         |            |                                                   |        |
| 4 - 6 anos                           | 99 (44)    | 20/99 (20,2)                                      | 0,1    |
| 7 - 10 anos                          | 90 (40)    | 18/90 (20)                                        | 0,1    |
| 11 - 14 anos                         | 36 (16)    | 4/36 (11,1)                                       |        |
| <b>Sexo</b>                          |            |                                                   |        |
| Masculino                            | 134 (59,6) | 25/134 (18,7)                                     |        |
| Feminino                             | 91 (40,4)  | 17/91 (18,7)                                      | 0,9    |
| <b>Grupo</b>                         |            |                                                   |        |
| Asma Exacerbada (AE)                 | 92 (40,9)  | 15/92 (16,3)                                      | 0,4    |
| Asma Não Exacerbada (ANE)            | 61 (27,1)  | 9/61 (14,8)                                       |        |
| Infecção do Trato Respiratório (ITR) | 72 (32)    | 18/72 (25)                                        | 0,07   |
| <b>Tabagismo familiar</b>            |            |                                                   |        |
| Algum fumante                        | 85 (38,3)  | 12/85 (14,1)                                      |        |
| Nenhum fumante                       | 137 (61,7) | 28/137 (20,4)                                     | 0,1    |
| SI 3                                 |            |                                                   |        |
| <b>Vacina FLU</b>                    |            |                                                   |        |
| Não                                  | 121 (54,5) | 25/121 (20,7)                                     | 0,1    |
| Uma ou duas doses                    | 101 (45,5) | 16/101 (15,8)                                     |        |
| SI 3                                 |            |                                                   |        |
| <b>Período de Coleta</b>             |            |                                                   |        |
| Período seco                         | 172 (76,4) | 26/172 (15,12)                                    |        |
| Período chuvoso                      | 53 (23,6)  | 16/53 (30,19)                                     | 0,009* |

\*Valor estatisticamente significativo

Dos 225 pacientes envolvidos no estudo, 44% (99) constituíram o grupo na faixa etária de quatro a seis anos de idade, com um predomínio de crianças do sexo masculino (59,6%). Para composição dos grupos de estudo, 92 crianças foram agrupadas como asmáticas exacerbadas (40,9%), 61 crianças (27,1%) asmáticas não exacerbadas ou estáveis e 72 (32%)

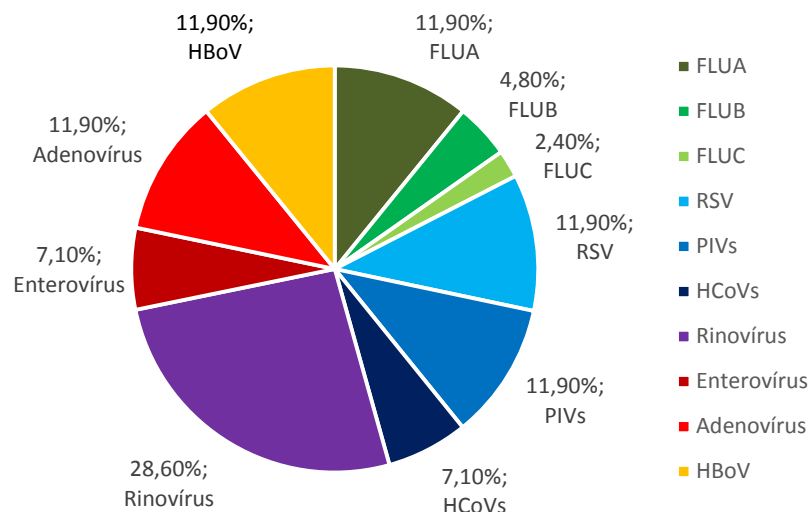
como infecção do trato respiratório. Outras características da população estudada encontram-se listadas na tabela 4.

Todas as amostras foram analisadas pelo protocolo proposto, e após finalizados os ensaios moleculares, um espécime representativo de cada vírus detectado foi selecionado para o sequenciamento genômico. As sequências de qualidade foram utilizadas para elaboração de uma sequência consenso (contig). Os contigs obtidos foram submetidos ao alinhamento local com sequências depositadas em banco de dados (NCBI) sendo comprovada a especificidade dos fragmentos amplificados.

Do total de amostras analisadas, 42 apresentaram positividade para pelo menos um dos vírus pesquisados, resultando em um índice global de detecção de 18,6%. Análise estatística considerando a positividade viral em relação às características da população como idade, sexo, relato de tabagismo familiar e vacinação para Influenza não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ), embora tenha sido observado maior índice de detecção viral entre crianças com idade inferior a seis anos (20,2%) (Tabela 4).

Para a avaliação do índice de detecção viral em relação aos grupos estudados, foram consideradas as amostras com positividade para pelo menos um vírus. O maior índice de positividade viral foi observado no grupo de crianças com infecção do trato respiratório (25,0%). Entre crianças apresentando exacerbação asmática (AE) o índice observado foi de 16,3%, maior do que o identificado para o grupo controle, constituído de crianças com asma estável (ANE) (14,7%) (Tabela 4), embora esses dados não tenham sido estatisticamente significativos ( $p>0,05$ ).

Entre os indivíduos positivos, observou-se um maior percentual de Rinovírus (12/42 - 28,6%), seguidos por FLUA (5/42 - 11,9%), Adenovírus (5/42 - 11,9%), HBoV (5/42 - 11,9%), RSVA (4/42 - 9,5%), Enterovírus (3/42 - 7,1%), FLUB (2/42 - 4,8%), PIV2 (2/42 - 4,8%), PIV3 (2/42 - 4,8%), HCoV OC43 (2/42 - 4,8%), FLUC (1/42 - 2,4%), RSVB (1/42 - 2,4%), PIV1 (1/42 - 2,4%) e HCoV 229E (1/42 - 2,4%) (Tabela 5). PIV4 e hMPV não foram detectados em nenhuma amostra neste estudo. A Figura 2 ilustra a positividade viral encontrada nas amostras analisadas.



**Figura 2. Positividade para os vírus respiratórios pesquisados**

Adicionalmente, nas amostras de quatro pacientes ocorreu a co-deteção de dois agentes virais, nas quais os Rinovírus foram detectados em três. As amostras com mais de um vírus detectado apresentaram positividade para Rinovírus + PIV3; Rinovírus + PIV2; Enterovírus + HBoV e Rinovírus + FLUB (Tabela 6). Dessas, duas foram obtidas de pacientes com asma exacerbada, uma no grupo controle e uma no grupo de crianças apresentando apenas infecção do trato respiratório.

**Tabela 5. Vírus detectados no estudo\***

| Apenas um vírus detectado | Número de amostras |
|---------------------------|--------------------|
| FLUA                      | 5                  |
| FLUB                      | 1                  |
| FLUC                      | 1                  |
| RSVA                      | 4                  |
| RSVB                      | 1                  |
| PIV1                      | 1                  |
| PIV2                      | 1                  |
| PIV3                      | 1                  |
| HCoV OC43                 | 2                  |
| HCoV 229E                 | 1                  |
| Rinovírus                 | 9                  |
| Enterovírus               | 2                  |
| Adenovírus                | 5                  |
| HBoV                      | 4                  |
| <b>Total</b>              | <b>38</b>          |

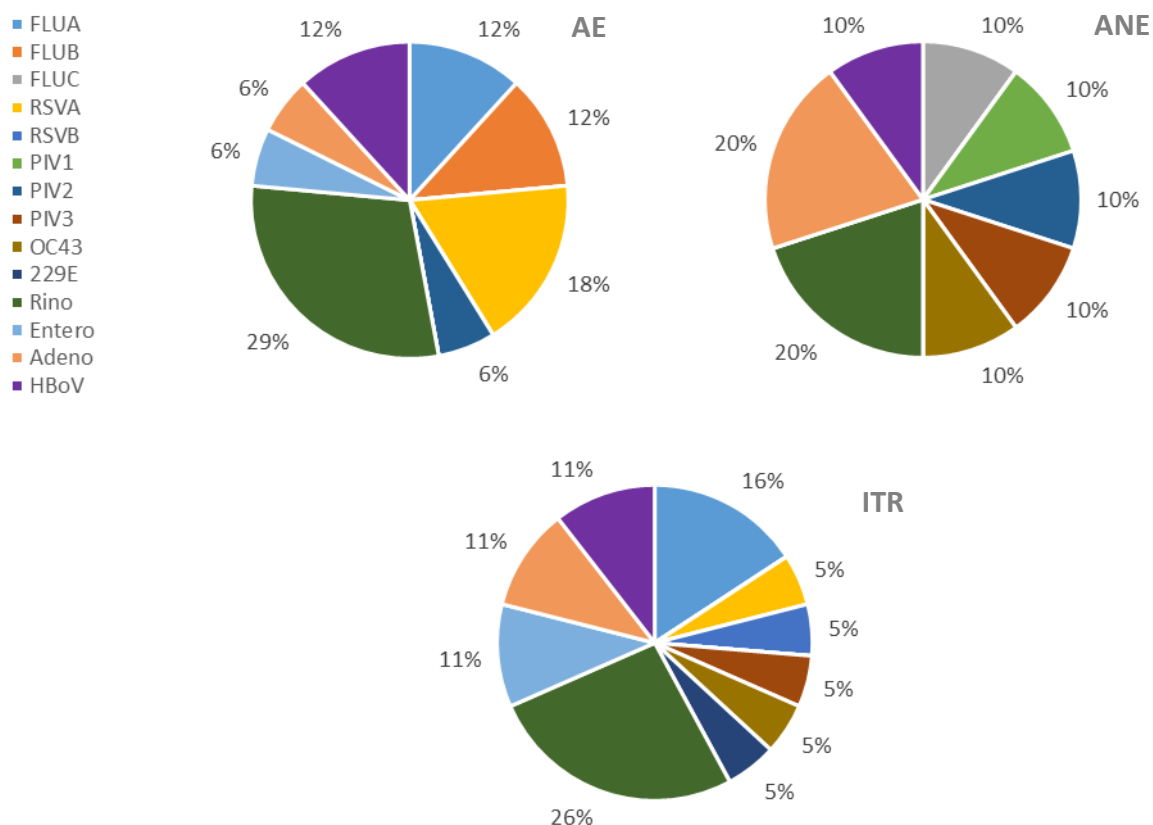
\*PIV4 e hMPV não foram detectados

**Tabela 6. Amostras apresentando co-deteção**

| Dois vírus detectados | Número de amostras |
|-----------------------|--------------------|
| Rinovírus + PIV2      | 1                  |
| Rinovírus + PIV3      | 1                  |
| Rinovírus + FLUB      | 1                  |
| Enterovírus + HBoV    | 1                  |
| <b>Total</b>          | <b>4</b>           |

Observou-se ainda o perfil diferenciado da detecção viral nos três grupos populacionais do estudo (Figura 3). Os Rinovírus foram detectados em grande porcentagem de amostras dos três diferentes grupos. Comparando-se o grupo de asmáticos exacerbados com o grupo controle, foi detectado maior índice de positividade por Rinovírus entre os pacientes apresentando exacerbação.

Outros dois vírus detectados quase exclusivamente em quadros de exacerbação asmática foram os Influenza (A e B) e os RSV (A e B). O único grupo em que também foram detectados, embora em menor porcentagem, foi o grupo de crianças apresentando apenas infecção do trato respiratório (Tabela 7).



**Figura 3. Positividade viral em relação aos grupos de estudo**

Ressalta-se a grande diversidade de vírus detectados no grupo de crianças com infecção do trato respiratório. Nesse grupo apenas os vírus FLUB e FLUC não foram detectados (Figura 3, Tabela 7).

**Tabela 7. Análise do índice de detecção viral em relação aos grupos de estudo**

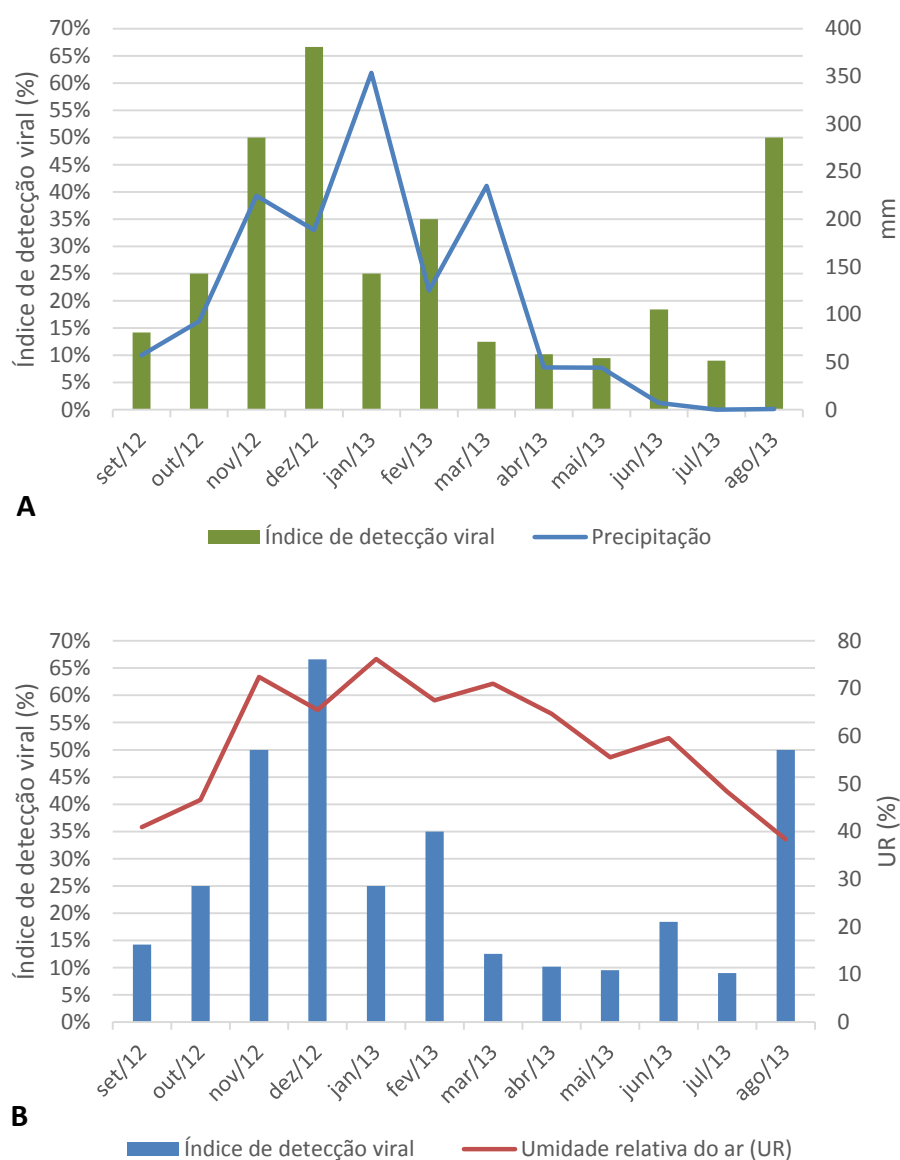
|                      | <b>Asma<br/>Exacerbada<br/>n = 92 (%)</b> | <b>Asma não<br/>exacerbada<br/>n = 61 (%)</b> | <b>p</b>   | <b>Asma<br/>Exacerbada<br/>n = 92 (%)</b> | <b>Infecção do Trato<br/>Respiratório<br/>n = 72 (%)</b> | <b>p</b>   |
|----------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------|
| FLUA                 | 2 (2.2)                                   | 0                                             |            | 2 (2.2)                                   | 3 (4.2)                                                  | 0.2        |
| FLUB                 | 2 (2.2)                                   | 0                                             |            | 2 (2.2)                                   | 0                                                        |            |
| FLUC                 | 0                                         | 1 (1.6)                                       |            | 0                                         | 0                                                        |            |
| RSV (A, B)           | 3 (3.3)                                   | 0                                             |            | 3 (3.3)                                   | 2 (2.7)                                                  | 0.4        |
| PIV (1, 2, 3)        | 1 (1.08)                                  | 3 (4.9)                                       | 0.09       | 1 (1.08)                                  | 1 (1.4)                                                  | 0.4        |
| HCoV<br>(OC43, 229E) | 0                                         | 1 (1.6)                                       |            | 0                                         | 2 (2.7)                                                  |            |
| Enterovírus          | 1 (1.08)                                  | 0                                             |            | 1 (1.08)                                  | 2 (2.7)                                                  | 0.2        |
| Rinovírus            | 5 (5.43)                                  | 2 (3.2)                                       | 0.2        | 5 (5.43)                                  | 5 (6.9)                                                  | 0.3        |
| Adenovírus           | 1 (1.08)                                  | 2 (3.2)                                       | 0.2        | 1 (1.08)                                  | 2 (2.7)                                                  | 0.2        |
| HBoV                 | 2 (2.2)                                   | 1 (1.6)                                       | 0.4        | 2 (2.2)                                   | 2 (2.7)                                                  | 0.4        |
| <b>Total</b>         | <b>17 (18.4)</b>                          | <b>10 (16.3)</b>                              | <b>0.3</b> | <b>17 (18.4)</b>                          | <b>19 (26.3)</b>                                         | <b>0.1</b> |

Dos pacientes asmáticos exacerbados com pelo menos um vírus detectado em suas amostras respiratórias, 80% apresentaram febre. Nesse mesmo grupo de pacientes, aqueles que apresentaram febre e não tiveram nenhum vírus detectado constituíram apenas 55,4% ( $p = 0.03$ , IC 95%) (Tabela 8). Em relação aos demais sintomas apresentados pelos pacientes, segundo informações obtidas pelo questionário, não observou-se relação estatisticamente significativa entre a presença de sintomas e a positividade, em nenhum dos grupos de estudo (Tabela 8).

**Tabela 8. Análise da positividade viral e presença de sintomas para os grupos AE e ITR**

| <b>Sintomas</b> | <b>Asmáticos Exacerbados (AE)</b>                        |                                                          | <b>p</b> | <b>Infecção do Trato Respiratório (ITR)</b>              |                                                          | <b>p</b> |
|-----------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------|
|                 | <b>Pacientes com<br/>vírus detectados<br/>n = 15 (%)</b> | <b>Pacientes sem<br/>vírus detectados<br/>n = 77 (%)</b> |          | <b>Pacientes com<br/>vírus detectados<br/>n = 18 (%)</b> | <b>Pacientes sem<br/>vírus detectados<br/>n = 54 (%)</b> |          |
| Febre           | 12 (80)                                                  | 42 (55.4)                                                | 0,03     | 13 (72.2)                                                | 48 (88.8)                                                | -        |
| Tosse           | 15 (100)                                                 | 74 (96.1)                                                | 0,2      | 18 (100)                                                 | 52 (96.2)                                                | 0.2      |
| Coriza          | 12 (80)                                                  | 62 (80.5)                                                | 0,4      | 18 (100)                                                 | 49 (90.7)                                                | 0.1      |
| Mialgia         | 9 (60)                                                   | 32 (41.5)                                                | 0,1      | 13 (72.2)                                                | 31 (57.4)                                                | 0.1      |
| Dor de garganta | 9 (60)                                                   | 38 (49.3)                                                | 0,2      | 12 (66.6)                                                | 30 (55.5)                                                | 0.2      |

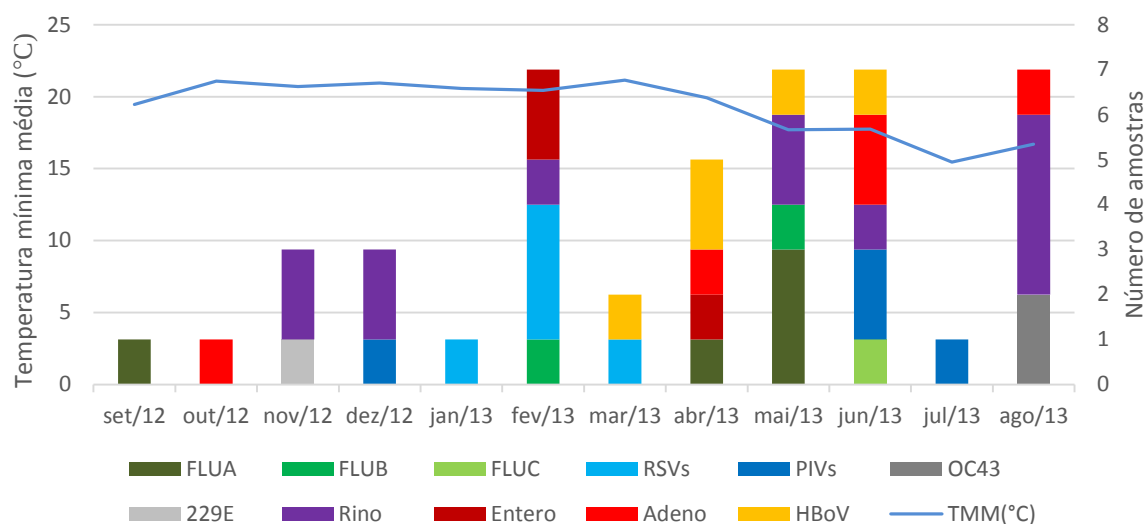
Os vírus identificados apresentaram distribuição durante todo o período entre setembro/2012 a agosto/2013. A maioria dos vírus foram detectados em amostras coletadas durante os meses de maior precipitação pluviométrica e maior umidade relativa do ar (UR) durante o ano (Figura 4). Apesar de maior número de amostras ter sido coletado durante os meses de baixa precipitação pluviométrica, a taxa de detecção viral foi maior durante a estação chuvosa (30.19%,  $p = 0.009$ , IC 95%) (Tabela 4), compreendendo os meses de outubro/2012 a março/2013 (Figura 4).



**Figura 4. Variação do índice de detecção viral durante os meses de estudo em relação à (A) precipitação média (B) umidade relativa do ar (UR)**

Embora o pequeno número de amostras positivas, análise considerando os meses de estudo revelou picos de detecção nos meses de fevereiro, maio, junho e agosto do ano de 2013,

além de quatro grupos virais apresentarem um perfil de circulação parcialmente definido (Figura 5). Os RSVs foram detectados apenas nos meses de janeiro a março, trimestre de maior UR e precipitação pluviométrica do período. Os vírus *Influenza* (A, B e C) predominantemente foram detectados nos meses de abril a junho, meses logo após a temporada chuvosa cuja temperatura mínima média encontrava-se em declínio. Já os PIVs foram detectados de junho a julho, meses de temperatura mais baixa durante todo o ano. Os HBoV foram detectados no período de março a junho de 2013, com pico de detecção no mês de abril. Os Rinovírus foram detectados durante todo o ano, e para os outros vírus identificados, nenhum padrão foi definido (Figura 5).



**Figura 5. Distribuição dos vírus identificados durante os meses de estudo**

## 6 DISCUSSÃO

---

Este constitui o primeiro estudo de investigação molecular de vírus respiratórios em população pediátrica na região Centro-Oeste, considerando três grupos de estudo com perfis diferenciados no que se refere à apresentação dos sintomas. Nesse contexto, análise considerando os grupos de estudo investigados revelou maior índice de detecção viral no grupo de crianças apresentando infecção do trato respiratório (25%). Considerando as crianças asmáticas, foi observado maior índice de detecção viral no grupo de crianças asmáticas exacerbadas (16,3%) em relação ao grupo de crianças apresentando asma estável (14,7%), embora esse resultado não tenha apresentado significância estatística ( $p > 0.05$ ). Observa-se assim que a ocorrência de infecção do trato respiratório nos dois grupos apresenta a mesma frequência. Entretanto, considerando o grupo de asmáticos, a presença de infecção viral tem sido demonstrada como um fator relevante na evolução para quadros sintomáticos mais graves (Sandrock & Norris 2015).

O índice de detecção viral identificado em nosso estudo é próximo de outros dados descritos na literatura. Estudos visando a detecção de vírus em amostras do trato respiratório em diferentes regiões do mundo têm descrito índices de 25,7% a 80% em crianças sintomáticas (Althani et al. 2012, Bicer et al. 2013, Culebras et al. 2013, Dierig et al. 2014). No Brasil, estudos similares demonstram índices variando de 31 a 85% (Bezerra et al. 2011, Albuquerque et al. 2012). No entanto, os índices de positividade nessas investigações devem ser avaliados considerando diversos aspectos.

A diversidade de metodologias utilizadas para a triagem viral, incluindo até mesmo o método de coleta empregado, e ainda, dados relacionados à região geográfica, como características climáticas e meteorológicas podem interferir nos resultados observados. Ademais, fatores intrínsecos ao grupo populacional avaliado, como a faixa etária dos pacientes, a presença de sintomas respiratórios ou mesmo de doenças crônicas preexistentes contribuem de forma relevante nas investigações, levando à diversidade de índices de prevalência e alterando o padrão de vírus circulantes.

A taxa de positividade encontrada pode também estar associada à faixa etária das crianças do estudo, relativamente mais alta em comparação com outros trabalhos da literatura. A maioria dos estudos avalia grupos de crianças mais jovens, com idade inferior a cinco anos (Bezerra et al. 2011, Laguna-Torres et al. 2011, Culebras et al. 2013, Ju et al. 2014). Essa tendência também foi observada no presente estudo, com maiores índices de detecção viral

entre os pacientes de menor faixa etária (4 – 6 anos), embora o dado não tenha sido estatisticamente significativo.

Destaca-se ainda a presença de um número significativo de crianças assintomáticas com positividade viral. Do grupo constituído por 61 crianças asmáticas estáveis assintomáticas, 14,8% tiveram amostras positivas para pelo menos um vírus, condição descrita na literatura. Estudo conduzido em crianças asmáticas assintomáticas do Reino Unido, na faixa etária de um a 14 anos relatou índice de detecção viral de 35%, e os vírus mais frequentemente detectados foram Adenovírus e Rinovírus (Thavagnanam et al. 2010).

No contexto da asma, torna-se importante considerar a condição de exacerbação na presença de vírus. O papel das infecções virais respiratórias em exacerbações asmáticas não foi claramente estabelecido por alguns autores, corroborando os resultados do presente estudo. Camara et al. (2004) também não observaram diferenças estatisticamente significativas entre o índice de detecção viral em pacientes sibilantes e grupo controle assintomático. Nesse estudo caso-controle, foram recrutadas crianças de 2 a 12 anos de idade, hospitalizadas apresentando sibilância e necessidade de tratamento com beta agonistas. Crianças na mesma faixa etária hospitalizadas por outras razões, sem sintomas respiratórios, constituíram o grupo controle (Camara et al. 2004).

Por outro lado, estudos têm apontado resultados interessantes ao relacionar a ocorrência de infecções virais em pacientes asmáticos. Nos EUA, em 63,1% das amostras de pacientes com exacerbação asmática (triadas por Multiplex PCR comercial) foi detectado pelo menos um vírus, enquanto em grupo de pacientes com asma estável o índice foi de 23,4% (OR 5.6, 2.7 – 11.6, IC 95%). As crianças envolvidas nesse estudo apresentaram de dois a 17 anos de idade (Khetsuriani et al. 2007). Leung et al. (2013) realizaram estudo envolvendo crianças de três a 18 anos de idade apresentando exacerbação asmática (critério definido pela *British Thoracic Society* e GINA). Pacientes apresentando asma estável foram recrutados e constituíram o grupo controle. Dentre os pacientes asmáticos exacerbados foi observado índice de detecção viral de 50% frente 26% observado no grupo controle ( $p < 0.001$ , IC 95%), após triagem molecular das amostras por Multiplex *Nested*-PCR (Leung et al. 2013).

Resultado semelhante foi encontrado por estudo realizado na Turquia, em crianças asmáticas entre três e 17 anos de idade. De um total de 135 pacientes, 104 foram classificados como asmáticos exacerbados segundo critérios internacionais (GINA 2014) e 31 apresentaram asma estável (grupo controle). A detecção viral realizada por Multiplex qPCR resultou em índice de 53,8% no grupo exacerbado, enquanto que no grupo controle apenas em 22,6% das amostras foi detectado pelo menos um vírus ( $p = 0.012$ , IC 95%) (Ozcan et al. 2011). Esses

dados reforçam a necessidade de investigações mais robustas para melhor compreensão do papel das infecções virais na evolução de quadros asmáticos.

Considerando a distribuição dos vírus detectados, houve uma predominância expressiva dos Rinovírus (28,6%), seguido por FLUA (11,9%), Adenovírus (11,9%), HBoV (11,9%) e RSVA (9,5%). Esse achado é consoante com outros estudos que descrevem os Rinovírus, RSV e FLU como os vírus mais detectados em amostras respiratórias de pacientes pediátricos sintomáticos. Estudo recente realizado por Anders et al. (2015) no Vietnã, cuja população consistiu de crianças no primeiro ano de vida apresentando infecção aguda do trato respiratório, evidenciou a predominância das infecções por Rinovírus em 33% das amostras positivas para pelo menos um vírus, HBoV em 22%, FLUA em 11% e RSV, também em 11% (Anders et al. 2015). Lu et al. (2013) também observaram maior frequência dos Rinovírus (19,7%) entre amostras positivas de crianças com idade abaixo de 14 anos apresentando infecção aguda do trato respiratório na província de Shandong, China. Outros vírus frequentemente detectados foram os PIV (17,7%) e os FLU (13,9%) (Lu et al. 2013). Em estudo com crianças apresentando ITR, de idade inferior a 15 anos, em Barcelona, Espanha, Martinez-Roig et al. (2015) detectaram RSVB em 36,1% das amostras positivas para algum vírus. Os Rinovírus vieram em seguida, contribuindo com 29,6%. RSVA, FLUA e HBoV foram detectados em 28,8%, 24,1% e 20% das amostras positivas, respectivamente (Martinez-Roig et al. 2015).

No Brasil, semelhantes dados reforçam a importância dos Rinovírus em quadros de infecção do trato respiratório. Albuquerque et al. (2012), em estudo realizado em crianças na faixa etária de um mês a 15 anos apresentando ITR, detectaram Rinovírus em 51% das amostras positivas para pelo menos um vírus, seguidos dos FLUA (7,8%), hMPV (7,8%), HBoV (7,8%) e RSV (4,7%). Ressalta-se a presença de vírus recentemente descritos entre os mais frequentes, como os HBoV, corroborando os resultados do presente estudo (Albuquerque et al. 2012). Em estudo multicêntrico, envolvendo crianças com quadro de ITR durante as primeiras semanas de vida, os RSV foram os vírus mais frequentes (33,1%), seguidos pelos Rinovírus (29,4%), HBoV (19,2%), hMPV (16,9%) e FLU (13,4%). (Arruda et al. 2014).

Considerando os quatro casos de co-deteção viral, os Rinovírus foram detectados em três. Os PIV por sua vez foram detectados em dois dos quatro eventos de co-deteção. A alta frequência das infecções por Rinovírus em eventos de co-deteção é descrita por diversos estudos. Entre crianças tailandesas apresentando sibilância e ITR, com idade inferior a dois anos, os Rinovírus foram os agentes infecciosos mais presentes em amostras respiratórias positivas para mais de um patógeno, seguidos dos RSV (Teeratakulpisarn et al. 2014). A co-

detecção de Rinovírus e RSV também foi relatada por Wozniak-Kosek et al. (2015), em estudo realizado na Polônia (Wozniak-Kosek 2015). Lu et al. (2013), em estudo citado anteriormente, também ressaltaram a alta frequência das co-detecções por Rinovírus e PIVs.

Além de expressiva predominância na população em geral, a positividade para Rinovírus (considerando apenas as amostras positivas para algum vírus) apresentou-se mais elevada (29,4%) no grupo de pacientes apresentando asma exacerbada. Embora em índices inferiores, a positividade para Rinovírus nos dois outros grupos de estudo (ANE = 20%; ITR = 26,3%) foi a mais prevalente dentre os 16 vírus avaliados. Levando em conta apenas os pacientes asmáticos, é interessante observar ainda a detecção quase exclusiva de dois grupos virais, *Influenza* e RSV, apenas em crianças com exacerbações asmáticas. No grupo de asmáticos estáveis apenas uma amostra foi positiva para FLUC, e nenhuma para RSV (A, B).

O papel das infecções por Rinovírus nos quadros de exacerbação asmática é extensamente pesquisado e comprovado por diversos estudos (Bizzintino et al. 2011, Jackson et al. 2011, Kloepfer et al. 2014, Sandrock & Norris 2015). Khetsuriani et al. (2007) encontraram prevalência dos Rinovírus em exacerbações asmáticas de 60% (OR = 5.6, 2.7 – 11.6, IC 95%) em comparação ao grupo de asmáticos estáveis. Da mesma forma, Ozcan et al. (2011) encontraram prevalência de 35,6% ( $p = 0.002$ , IC 95%). Leung et al. (2013) observaram prevalência de 26,2% ( $p = 0.018$ , IC 95%) em exacerbações asmáticas, dados em concordância com os resultados do presente estudo (Khetsuriani et al. 2007, Ozcan et al. 2011, Leung et al. 2013). Ademais, Kwon et al. (2014) observaram risco de exacerbação asmática relacionado à detecção de Rinovírus e *Influenza* de 3,9 (OR 1.4 – 10.5, IC 95%) e 4 (OR 1.2 – 13.8, IC 95%), respectivamente, em 28 crianças asmáticas com idade inferior a 8 anos em Seul, Coreia do Sul (Kwon et al. 2014).

Entre os pacientes apresentando exacerbação asmática, análise considerando a detecção viral demonstrou que a presença de sintomas como febre, tosse, coriza, mialgia e dor de garganta foi maior entre os pacientes com positividade para pelo menos um vírus. Entretanto, apenas para a presença de febre os dados foram estatisticamente significativos ( $p = 0.03$ , IC 95%). No grupo de crianças não asmáticas, apresentando ITR, essa relação não foi bem estabelecida. A síndrome respiratória aguda grave (SRAG), principalmente em pacientes febris, ainda constitui a maior razão para a prescrição de antibióticos na prática clínica (Peterson & Dalhoff 2004, Pavia 2011). Nesse contexto, nossos resultados comprovam a importância do diagnóstico diferencial das infecções do trato respiratório, cujo benefício constituiria o incentivo ao uso parcimonioso de antimicrobianos.

Segundo dados do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) e IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), Goiânia é uma cidade com predominância do clima tropical com estação seca. A umidade relativa do ar é baixa na maior parte do ano, em decorrência da alta altitude do terreno. A temperatura é amena durante o ano, em média 24°C. Duas estações são bem definidas: uma estação chuvosa, compreendendo os meses de outubro até o início de abril, e uma estação seca, de maio a setembro. Entre os meses de setembro de 2012 a setembro de 2013, foram registradas temperatura média de 25°C, temperatura mínima média de 19,3°C e temperatura máxima média de 31,9°C. A média da umidade relativa do ar nesse período foi de 57,7% e a precipitação média de 108,1 mm (IBGE 2015, INMET 2015).

Ensaaios laboratoriais *in vitro* e em modelos animais têm sugerido uma relação inversa entre a umidade relativa do ar (UR) e a manutenção da viabilidade de partículas virais de vírus envelopados, como FLU, RSV e PIV. Essas inferências basearam-se na alta estabilidade dos vírions em situação de baixa UR, e moderada, em alta UR (Tang 2009, Tellier 2009).

Embora em regiões de clima temperado o perfil sazonal das infecções virais do trato respiratório seja bem definido, em regiões de clima tropical, principalmente em climas úmidos, esse perfil ainda é controverso (Lofgren et al. 2007, Lowen et al. 2007, Yusuf et al. 2007, Ouedraogo et al. 2014).

No presente estudo foi observada relação direta entre o índice de detecção viral e UR, com os maiores índices de detecção viral sendo observados nos meses de outubro/2012 a março/2013 ( $p = 0.009$ , IC 95%), coincidindo com a estação chuvosa, período de maior UR e precipitação pluviométrica.

Em outros países tropicais estudos têm encontrado resultados similares ao avaliar a sazonalidade das infecções virais respiratórias. Tang et al. (2010) em crianças hospitalizadas com ITR em Hong Kong, encontraram relação direta entre o índice de detecção viral e UR (Tang et al. 2010). Maior índice de detecção viral também foi encontrado nos meses de maior precipitação pluviométrica por Khor et al. (2012), em estudo retrospectivo entre crianças hospitalizadas com ITR provenientes de hospital terceirizado na Malásia (Khor et al. 2012). Em Honduras, a precipitação pluviométrica foi estatisticamente significativa em relação à circulação de vírus como FLU ( $p < 0.001$ , IC 95%), PIV (1, 3 e 4) ( $p < 0.001$ , IC 95%), hMPV ( $p = 0.018$ , IC 95%) e RSV ( $p < 0.001$ , IC 95%), em estudo conduzido em crianças com idade inferior a cinco anos apresentando ITR (Schlaudecker et al. 2012).

O Brasil é o quinto maior país do globo, com área superior a oito milhões de km<sup>2</sup>. Esse fato, em conjunto com sua disposição geográfica, confere uma grande diversidade de subtipos climáticos às suas regiões (IBGE 2015). Concomitantemente com a diversidade climática do

país, os dados sazonais de circulação dos vírus respiratórios também são variados. Na região Nordeste, observou-se associação estatisticamente significativa entre os picos de detecção para FLU e a estação chuvosa, em estudo realizado durante sete anos, envolvendo crianças apresentando ITR, com idade inferior a 16 anos na cidade de Fortaleza, Ceará. Dados de outros vírus detectados não foram disponibilizados (Moura et al. 2009). Por outro lado, nas regiões Sul e Sudeste, observa-se relação inversa entre UR e índices de detecção viral (Gardinassi et al. 2012, Silva et al. 2013). Além disso, no sul do Brasil as baixas temperaturas estão relacionadas com a maior circulação viral, provavelmente em decorrência do clima subtropical e temperado observado nessa região (Silva et al. 2013).

A dificuldade de traçar um perfil sazonal das infecções virais do trato respiratório também advém da diversidade de patógenos envolvidos com o quadro infeccioso. Os vírus responsáveis por causar ITR variam em diversos aspectos já citados, como estrutura e método de disseminação e transmissão entre hospedeiros. Dessa forma, a definição de perfis individuais e específicos de circulação para cada vírus têm obtido resultados mais precisos (Anders et al. 2015).

Nesse cenário, os RSV foram detectados nos meses de janeiro a março, correspondendo aos meses de maior precipitação pluviométrica e de maior UR durante a estação chuvosa. Já os *Influenza* foram detectados em sua maioria nos meses de abril a junho de 2013, meses marcados pelo declínio da UR após o período chuvoso. Esse resultado está de acordo com estudos prévios onde foi avaliada a sazonalidade dos RSV. Tang et al. (2010) e Khor et al. (2012) encontraram perfil semelhante de circulação dos RSV em seus estudos conduzidos em Hong Kong e Malásia, respectivamente. Anders et al. (2015), em estudo realizado em crianças vietnamitas recém-nascidas acompanhadas até o primeiro ano de idade, demonstraram que as infecções por RSV também se agrupavam apenas nos meses de maior precipitação pluviométrica. Em relação aos *Influenza*, foram observados dois picos de detecção, o primeiro durante a estação chuvosa, e o segundo durante a estação seca (Anders et al. 2015). Os resultados do presente estudo para RSV e FLU também foram corroborados por levantamento epidemiológico para o ano de 2013 na região Centro-Oeste, pelo Ministério da Saúde (Brasil 2013).

Para Rinovírus nenhum perfil de circulação pôde ser definido, sendo identificado durante todo o ano, o que está de acordo com estudo realizado por Anders et al. (2015) no Vietnã. Sua circulação aparentemente durante o ano todo em conjunto com o reduzido número de amostras coletadas no mês de agosto/2013 foi responsável pelo alto índice de detecção viral observado no referido mês. Os HBoV foram detectados nos meses de março a junho de 2013,

meses coincidentes com a queda contínua da precipitação pluviométrica, da UR, e da temperatura mínima. Outros estudos confirmam a circulação predominante dos HBoV durante o inverno (Allander et al. 2005), embora dados também sugiram a predominância das infecções durante os períodos mais úmidos e chuvosos do ano (de Leon et al. 2013, Anh et al. 2014).

O estudo apresentou algumas limitações que prejudicaram as análises estatísticas. Primeiro, do quantitativo amostral inicialmente coletado foi perdido um número significativo de amostras, por insuficiência do material clínico ou inconsistência das informações do questionário. Esse fato pode ter reduzido o poder de inferência da amostragem entre o grupo asmático e o grupo controle. Segundo, o número total de controles asmáticos estáveis foi menor em comparação com o número de casos de exacerbação asmática, em decorrência da dificuldade do recrutamento de pacientes asmáticos estáveis sem a presença de sintomas respiratórios, desafio também encontrado por outros autores (Ozcan et al. 2011, Leung et al. 2013). Por fim, não houve um padrão quanto à qualidade da coleta. A grande rotatividade de profissionais responsáveis pela coleta pode ter causado a heterogeneidade de qualidade observada, e, dessa forma, ter interferido na obtenção dos resultados.

Não obstante, os dados obtidos reforçam a importância das infecções respiratórias virais na população pediátrica. Embora o índice de detecção viral não tenha sido significativo entre os pacientes apresentando asma exacerbada e asma estável, a presença desses agentes infecciosos em crianças constitui um fator a ser considerado ao traçar-se estratégias de prevenção e controle dos quadros de ITR, e seu impacto em quadros preexistentes de asma. Além disso, os resultados agregam conhecimento sobre a circulação e sazonalidade desses patógenos na região.

## 7 CONCLUSÕES

---

- Foram detectados vírus respiratórios em 18,6% (42/225) de todas as amostras testadas.
- Em quatro amostras foram detectados mais de um vírus.
- O índice de detecção viral no grupo de crianças apresentando infecção do trato respiratório foi de 25%. No grupo de crianças asmáticas exacerbadas, o índice de detecção viral foi de 16,3%, enquanto no grupo de asmáticos estáveis o índice encontrado foi de 14,8%;
- Os Rinovírus foram os vírus mais frequentemente detectados, em 28,6% das amostras positivas, seguidos pelos FLUA (11,9%), Adenovírus (11,9%), HBoV (11,9%) e RSVA (9,5%). Os Rinovírus foram detectados em todos os grupos de estudo, mas em maior porcentagem entre crianças asmáticas exacerbadas (29%). Os *Influenza* e RSV foram detectados predominantemente no grupo de asmáticos exacerbados.
- Em relação ao grupo de asmáticos exacerbados, a presença de sintomas foi maior entre os pacientes com positividade para pelo menos um vírus, embora nem todos os dados tenham sido estatisticamente significativos.
- Os maiores índices de positividade viral foram obtidos durante a estação chuvosa da região, período de maior precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar (UR). Os RSV foram detectados nos meses de maior precipitação e UR enquanto os FLU e HBoV foram detectados nos meses da estação seca. Os demais vírus detectados não apresentaram padrão claro de circulação.

## REFERÊNCIAS

---

- Aherne W, Bird T, Court SDM et al. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J clin Path*, 23: 7 – 18, 1970.
- Ahmed JA, Katz MA, Auko E et al. Epidemiology of respiratory viral infections in two long-term refugee camps in Kenya, 2007-2010. *BMC Infect Dis*, 12 (7): 1 – 9, 2012.
- Albuquerque MCM, Varella RB, Santos N. Acute respiratory viral infections in children in Rio de Janeiro and Teresópolis, Brazil. *Rev Inst Med Trop*, 54: 249 – 255, 2012.
- Ali SA, Gern JE, Hartert TV et al. Real-world comparison of two molecular methods for detection of respiratory viruses. *Virol J*, 8 (332): 1 – 7, 2011.
- Allander T, Tammi MT, Eriksson M et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *PNAS*, 102 (36): 12891 – 12896, 2005.
- Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol*, 37: 149 – 157, 1992.
- Al-Tawfiq JA. Middle East Respiratory Syndrome-coronavirus infection: An overview. *J Infect Public Health*, 6: 319 – 322, 2013.
- Althani A, Bushra S, Shaath N et al. Characterization of winter respiratory viral infections in patients with asthma and COPD in Qatar. *Arch Virol*, publicado online, 2012.
- American Academy of Pediatrics. Adenovirus infections, p. 190–192. Red book. Report of the Committee on Infectious Diseases, 26th ed. American Academy of Pediatrics, Elk Grove Village, IL. 2003.
- Amin NM, El Basha NR, El Rifai NM et al. Viral causes of acute respiratory infection among Egyptian children hospitalized with severe acute asthma exacerbations. *J Egypt Public Health Assoc*, 88: 52 – 56, 2013.
- Anders KL, Nguyen HL, Nguyen NM et al. Epidemiology and Virology of Acute Respiratory Infections during the First Year of Life: a birth cohort study in Vietnam. *Pediatr Infect Dis J*, 34 (4): 361 – 370, 2015.
- Anh JG, Choi SY, Kim DS et al. Human Bocavirus isolated from children with Acute Respiratory Tract Infection in Korea, 2010 – 2011. *J Med Virol*, 86 (12): 2011 – 2018, 2014.
- Arens MQ, Buller RS, Rankin A et al. Comparison of the Eragen multi-code respiratory virus panel with conventional viral testing and real-time multiplex PCR assays for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*, 48: 2387 – 2395, 2010.
- Arnott A, Vong S, Sek M et al. Genetic variability of human metapneumovirus amongst an all ages population in Cambodia between 2007 and 2009. *Infect Genet Evol*, 15: 43 – 52, 2013.
- Arruda E, Jones M, de Paula F et al. The Burden of Single Virus and Viral Coinfections on Severe Lower Respiratory Tract Infections Among Preterm Infants: A Prospective Birth Cohort Study in Brazil. *Pediatr Infect Dis J*, 33 (10): 997 – 1003, 2014.

Assiri A, McGeer A, Perl TM et al. Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *N Engl J Med*, 369: 407 – 416, 2013.

Auksornkitti V, Kamprasert N, Thongkomplew S et al. Molecular characterization of human respiratory syncytial virus, 2010 – 2011: identification of genotype ON1 and a new subgroup B genotype in Thailand. *Arch Virol*, 159: 499 – 507, 2014.

Azevedo AM, Durigon EL, Okasima V et al. Detection of influenza, parainfluenza, adenovirus and respiratory syncytial virus during asthma attacks in children older than 2 years old. *Allergol Immunopathol*, 31: 311–317, 2003.

Babady NE, Mead P, Stiles J et al. Comparison of the Luminex xTAG RVP Fast assay and the Idaho Technology FilmArray RP assay for detection of respiratory viruses in pediatric patients at a cancer hospital. *J Clin Microbiol*, 50: 2282 – 2288, 2012.

Bacharier LB, Boner A, Carlsen K-H et al. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy*, 63: 5 – 34, 2008.

Baric RS, Fu K, Schaad MC et al. Establishing a genetic recombination map for murine coronavirus strain A59 complementation groups. *Virology*, 177: 646 – 656, 1990.

Barik S. The structure of the 5' terminal cap of the respiratory syncytial virus mRNA. *J Gen Virol*, 74: 485 – 490, 1993.

Barker J, Stevens D, Bloomfield SF. Spread and prevention of some common viral infections in community facilities and domestic homes. *J Appl Microbiol*, 91: 7 – 21, 2001.

Basta HA, Sgro JY, Palmenberg AC. Modeling of the human rhinovirus C capsid suggests a novel topography with insights on receptor preference and immunogenicity. *Virology*, 448: 176 – 184, 2014.

Bastien N, Anderson K, Hart L et al. Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J Infect Dis* 191: 503 – 506, 2005.

Bawage SS, Tiwari PM, Pillai S et al. Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Adv Virol*, 2013: 1 – 26, 2013.

Bekmesian A, Fee C, Bekmesian S et al. Emergency department crowding and younger age are associated with delayed corticosteroid administration to children with acute asthma. *Pediatr Emerg Care*, 29: 1075 – 1081, 2013.

Benites CE, Cabrini DP, Silva AC et al. Acute respiratory viral infections in pediatric cancerpatients undergoing chemotherapy. *J Pediatr*, 90 (4) : 370 - 376, 2014.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a commonreceptor for Cocksackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275:1320–1323, 1997.

Berk AJ. Adenoviridae. In: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology, 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

Berry M, Gamiieldien J, Fielding BC. Identification of New Respiratory Viruses in the New Millennium. *Viruses*, 7: 996 – 1019, 2015.

Bezerra PGM, Britto MCA, Correia JB et al. Viral and Atypical Bacterial Detection in Acute Respiratory Infection in Children Under Five Years. *PLoS One*, 6 (4) : 1 – 9, 2011.

- Bicer S, Giray T, Çöl D et al. Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. *Ital J Pediatr*, 39 (22): 1 – 10, 2013.
- Bizzintino J, Lee WM, Laing IA et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur Respir J*, 37 (5): 1037 – 1042, 2011.
- Blaschke AJ, Allison MA, Meyers L et al. Non-invasive sample collection for respiratory virus testing by multiplex PCR. *J Clin Virol*, 52 (3): 210 – 214, 2011.
- Bochkov YA, Palmenberg AC, Lee W-M et al. Molecular modeling, organ culture and reverse genetics for a newly identified human rhinovirus C. *Nature Medicine*, 17: 627 – 632, 2011.
- Boone SA, Gerba CP. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. *Appl Environ Microbiol*, 73: 1687–1696, 2007.
- Brand HK, De Groot R, Galama JM et al. Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 47: 393 – 400, 2012.
- Brasil, Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-influenza>, 2013. Acesso em 08 de fev, 2015.
- Brasil, Ministério da Saúde. Informe Técnico de Influenza. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/22/informe-influenza-2009-2010-2011-220514.pdf>, 2012. Acesso em 08 de fev, 2015.
- Brasil, Ministério da Saúde. Profissional e gestor. Influenza. Vacinação. Disponível em: [www.http://portalsaude.saude.gov.br/index.php](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php). Acesso em 12 de mar, 2014a.
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria da Saúde do Estado de Goiás. Manual de Procedimentos. Coleta, acondicionamento e transporte de amostras biológicas. LACEN-GO. 1 – 128, 2010.
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 1 ed. 1 – 812, 2014b.
- Broor S, Krishnan A, Roy DS et al. Dynamic Patterns of Circulating Seasonal and Pandemic A (H1N1)pdm09 Influenza Viruses From 2007–2010 in and around Delhi, India. *PLoS One*, 7 (1): publicado online, 2012.
- Brosch L, Tchandja J, Marconi V, et al. Adenovirus serotype 14 pneumonia at a basic military training site in the United States, spring 2007: a case series. *Mil Med*, 174: 1295 – 1299, 2009.
- Camara AA, Silva JM, Ferriani VPL et al. Risk factors for wheezing in a subtropical environment: Role of respiratory viruses and allergen sensitization. *J Allergy Clin Immunol*, 113 (3): 551 – 557, 2004.
- Campanini G, Percivalle E, Baldanti F et al. Human respiratory syncytial virus (hRSV) RNA quantification in nasopharyngeal secretions identifies the hRSV etiologic role in acute respiratory tract infections of hospitalized infants. *J Clin Virol*, 39: 119 – 124, 2007.
- Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol*, 11: 103–16, 2001.
- Carvalho LM, de Paula FE, Silvestre RV et al. Prospective surveillance study of acute respiratory infections, influenza-like illness and seasonal influenza vaccine in a cohort of juvenile idiopathic arthritis patients. *Pediatr Rheumatol Online J*, 11 (10): 1 – 10, 2013.

Cauldwell AV, Long JS, Moncorgé O et al. Viral determinants of influenza A virus host range. *J Gen Virol*, 95: 1193 – 1210, 2014.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Isolation of avian influenza A(H5N1) viruses from humans: Hong Kong, May–December 1997. *Morb Mortal Wkly Rep*, 46: 1204 – 1207, 1997.

Chen AY, Cheng F, Lou S, et al. Characterization of the gene expression profile of human bocavirus. *Virology*, 403: 145 – 154, 2010.

Chow BD, Esper FP. The human bocaviruses: a review and discussion of their role in infection. *Clin Lab Med*, 29: 695 – 713, 2009.

Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML et al. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol*, 72: 484 – 495, 2004.

Coiras MT, Perez-Brena P, Garcia ML et al. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol*, 69: 132 – 144, 2003.

Collins PL, Carron RA. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

Costa E, Rodríguez-Domínguez M, Clari MA et al. Comparison of the performance of 2 commercial multiplex PCR platforms for detection of respiratory viruses in upper and lower tract respiratory specimens. *Diag Microbiol Infect Dis*, ainda não publicado, 2015.

Costa LDC. Pesquisa de vírus respiratórios em crianças asmáticas (exacerbadas e não exacerbadas) e em crianças não asmáticas com sintomas de infecção respiratória aguda, em Goiânia-Goiás. Goiânia [Tese de Doutorado em Ciências da Saúde – FM/UFG], 2014.

Culebras E, Betriu C, Vazquez-Cid E et al. Detection and genotyping of human respiratory viruses in clinical specimens from children with acute respiratory tract infections. *Rev Esp Quimioter*, 26 (1): 47 – 50, 2013.

Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*, 84: 2895 – 2908, 2003.

De la Tabla VO, Masia M, Antequera P et al. Comparison of combined Nose-Throat Swabs with Nasopharyngeal Aspirates for Detection of Pandemic Influenza A/H1N12009 Virus by Real-Time Reverse Transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*, 48: 3492 – 3495, 2010.

De Leon CA, Amantea SL, Pilger DA et al. Clinical and Epidemiological Profile of Lower Respiratory Tract Infections Associated with Human Bocavirus. *Pediatr Pulmonol*, 48 (11): 1112 – 1118, 2013.

De Paris F, Beck C, Pires MR et al. Viral epidemiology of respiratory infections among children at a tertiary hospital in Southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 47 (2): 223 – 226, 2014.

De Sousa R, Reusken C, Koopmans M. MERS coronavirus: Data gaps for laboratory preparedness. *J Clin Virol*, 59: 4 – 11, 2014.

Debur MC, Bordignon J, Santos CND et al. Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. *J Clin Virol*, 39: 59 – 62, 2007.

- Deng J, Ma Z, Huang W et al. Respiratory Virus Multiplex RT-PCR assay Sensitivities and Influence Factors in Hospitalized Children with Lower Respiratory Tract Infections. *Virol Sin*, 28 (2): 97 – 102, 2013.
- Dhariwal J, Edwards MR, Johnston SL. Anti-viral agents: potential utility in exacerbations of asthma. *Curr Opin Pharmacol*, 13: 331 – 336, 2013.
- Dierig A, Heron LG, Lambert SB et al. Epidemiology of respiratory viral infections in children enrolled in a study of influenza vaccine effectiveness. *Influenza and Other Respir Viruses*, 8 (3): 293 – 301, 2014.
- Dougherty RH, Fahy JV. Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. *Clin Exp Allergy*, 39: 193 – 202, 2009.
- Durbin AP, McAuliffe JM, Collins PL et al. Mutations in the C, D and V open reading frames of human parainfluenza virus type 3 attenuate replication in rodents and primates. *Virology*, 261: 319 – 330, 1999.
- Ebner K, M Suda, F Watzinder et al. Molecular detection and quantitative analysis of the entire spectrum of human adenoviruses by a two-reaction real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 43: 3049 – 3053, 2005.
- Edwards MR, Bartlett NW, Hussell T et al. The microbiology of asthma. *Nat Rev Microbiol*, 10: 459 – 471, 2012.
- El Sayed Zaki M, Raafat D, El Metaal AA. Relevance of serology for Mycoplasma pneumonia diagnosis compared with PCR and culture in acute exacerbation of bronchial asthma. *Am J Clin Pathol*, 131: 74 – 80, 2009.
- Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R et al. Genetic Variability of human Respiratory Syncytial Virus A Strains Circulating in Ontario: A Novel Genotype with a 72 Nucleotide G Gene Duplication. *PLoS One*, 7 (3): 1 – 10, 2012.
- Esper F, Weibel C, Ferguson D et al. Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *J Infect Dis*, 191: 492 – 498, 2005.
- Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ et al. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis*, 187: 785 – 790, 2003.
- Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M et al. Ten years of human metapneumovirus research. *J Clin Virol*, 53 (2): 97 – 105, 2012.
- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, 79:2814-22, 2005.
- Frank AL, Taber LH, Wells JM. Comparison of infection rates and severity of illness for Influenza A subtypes H1N1 and H3N2. *J Infect Dis*, 151: 73 – 80, 1985.
- Freymuth F, Vabret A, Brouard J et al. Detection of viral, Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae infections in exacerbations of asthma in children. *J Clin Virol*, 13: 131 – 139, 1999.
- Frost HH, Robinson CC, Dominguez SR. Epidemiology and Clinical Presentation of Parainfluenza Type 4 in Children: A 3-Year Comparative Study to Parainfluenza Types 1-3. *JID*, publicado online, 1 – 8, 2013.
- Fu L-S, Tsai M-C. Asthma Exacerbation in Children: A Practical Review. *Pediatr Neonatol*, 55: 83 – 91, 2014.

Fuhlbrigge A, Peden D, Apter AJ et al. Asthma outcomes: exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*, 129: 534 – 548, 2012.

Galvão MGA, Santos MARC, Cunha AJLA. Amantadine and rimantadine for influenza A in children and the elderly. *Cochrane Database of Syst Rev*, 11: publicado online, 2014.

Garcia J, Espejo V, Nelson M et al. Human rhinoviruses and enteroviruses in influenza-like illness in Latin America. *Viol J*, 10 (305): 1 – 12, 2013.

Gardinassi LG, Marques PVS, Salomao JB et al. Seasonality of viral respiratory infections in southeast of Brazil: the influence of temperature and air humidity. *Braz J microbial*, 43 (1): 98 – 108, 2012.

Garlapati S, Garg R, Brownlie R et al. Enhanced immune responses and protection by vaccination with respiratory syncytial virus fusion protein formulated with CpG oligodeoxynucleotide and innate defense regulator peptide in polyphosphazene microparticles. *Vaccine*, 30: 5206 – 5214, 2012.

Geng HY, Tan W. A Novel human coronavirus: Middle East respiratory syndrome human coronavirus. *Sci China Life Sci*, 56: 683 – 687, 2013.

Gern JE, Palmenberg AC. Rhinoviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

Gern JE. The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma. *J Virol*, 84: 7418 – 7426, 2010.

Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol*, 4: 26 – 33, 2014.

GINA – Global Initiative for Asthma. Disponível em: [www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA\\_Report\\_March13.pdf](http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_March13.pdf). Acesso em 08 de jan, 2014.

Gould D, Drey N. Preventing the spread of acute respiratory viral infections. *Nursing Standard*, 24 (5): 44 – 49, 2009.

Griffin MR, F. J., Walker MK, Iwane GA et al. Epidemiology of respiratory infections in young children: insights from the new vaccine surveillance network. *Pediatr Infect Dis J*, 23: 188 – 192, 2004.

Gruteke P, Glas AS, Dierdorp M et al. Practical Implementation of a Multiplex PCR for Acute Respiratory Tract Infections in Children. *J Clin Microbiol*, 42: 5596 – 5603, 2004.

Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol*, 71: 489 – 507, 2009.

Hançerli S, Somer A, Salman N et al. Clinical and Epidemiological Characteristics of Pandemic Influenzae A/(H1N1) in Hospitalized Pediatric Patients at a University Hospital, Istanbul. *Çocuk Enf Derg*, 4: 104 – 109, 2010.

Hao W, Bernard K, Patel N et al. Infection and propagation of human rhinovirus C in human airway epithelial cells. *J Virol*, 86 (24): 13524 – 13532, 2012.

Heiskanen-Kosma T, Korppi M, Jokinen C et al. Etiology of childhood pneumonia: serologic results of a prospective, population-based study. *Pediatr Infect Dis J*, 17: 986 – 991, 1998.

Henderson J, Hilliard TN, Sherriff A et al. Hospitalization for RSV bronchiolitis before 12 months of age and subsequent asthma, atopy and wheeze: a longitudinal birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol*, 16: 386 – 392, 2005.

- Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev*, 16: 242 – 264, 2003.
- Herfst S, Fouchier RA. Vaccination approaches to combat human metapneumovirus lower respiratory tract infections. *J Clin Virol*, 41: 49 – 52, 2008.
- Heymann PW, Carper HT, Murphy DD et al. Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing. *J Allergy Clin Immunol*, 114: 239 – 247, 2004.
- Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D et al. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis*, 12: 147 – 150, 2006.
- Huijskens E, Biesmans RC, Buiting AG et al. Diagnostic value of respiratory virus detection in symptomatic children using real-time PCR. *Virology Journal*, 9: 1 – 7, 2012.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Cidades. Disponível em: [www.cidades.ibge.gov.br](http://www.cidades.ibge.gov.br), acesso em 08/01/2015.
- INMET – Instituto Nacional de Meteorologia – Dados históricos. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>, acesso em 08/01/2015.
- Inoue Y, Shimojo N. Epidemiology of virus-induced wheezing/asthma in children. *Frontiers in Microbiology*, 4: 1 – 5, 2013.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus taxonomy: 2013 release. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 02 de jan, 2014.
- Jackson DJ, Johnston SL. The role of viruses in acute exacerbations of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 125 (6): 1178 – 1187, 2010.
- Jackson DJ, Sykes A, Mallia P, Johnston SL. Asthma exacerbations: Origin, effect, and prevention. *J Allergy Clin Immunol*, 128: 1165 – 1174, 2011.
- Jacobs ES, Lamson DM, George KS et al. Human Rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev*, 26 (1): 135 – 162, 2013.
- Jacobson LM, Redd JT, Schneider E et al. Outbreak of lower respiratory tract illness associated with human enterovirus 68 among American Indian children. *Pediatr Infect Dis J*, 31: 309 – 312, 2012.
- Jartti T, Hedman K, Jartti L et al. Human Bocavirus – the first 5 years. *Rev Med Virol*, 22: 46 – 64, 2012.
- Jartti T, Söderlund-Venermo M, Hedman K et al. New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children. *Paediatr Respir Rev*, 14: 38 – 45, 2013.
- Jefferson TO, Demichell V, Deeks JJ et al. Amantadine and rimantadine for preventing and treating influenza A in adults. *Cochrane Database of Syst Rev*, 2: publicado online, 2006.
- Johnson TR, Parker RA, Johnson JE et al. IL-13 insufficient for respiratory syncytial virus G glycoprotein-induced eosinophilia after respiratory syncytial virus challenge. *J Immunol*, 170: 2037 – 2045, 2003.
- Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 years old children. *BMJ*, 310: 1225 – 1229, 1995.
- Jones MS 2<sup>nd</sup>, Harrach B, Ganac RD et al. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol*, 81: 5978-5984, 2007.

- Ju X, Fang Q, Zhang J et al. Viral etiology of influenza-like illnesses in Huizhou, China, from 2011 to 2013. *Arch Virol*, 159 (8): 2003 – 2010, 2014.
- Kaplan BS, Webby RJ. The avian and mammalian host range of highly pathogenic avian H5N1 influenza. *Virus Res*, 178: 3 – 11, 2013.
- Kapoor A, Simmonds P, Slikas E et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis*, 201: 1633 – 1643, 2010.
- Kapoor A, Slikas E, Simmonds P et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis*, 199: 196 – 200, 2009.
- Karron RA, Collins PL. Parainfluenza Viruses. *In*: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology, 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.
- Kherad O, Kaiser L, Bridevaux PO et al. Upper-respiratory viral infection, biomarkers, and COPD exacerbations. *Chest*, 138: 896 – 904, 2010.
- Khetsuriani N, Kazerouni NN, Erdman DD et al. Prevalence of viral respiratory tract infections in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 119 (2): 314 – 321, 2007.
- Khor CS, Sam IC, Hooi OS et al. Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. *BMC Pediatrics*, 12 (32): 1 – 9, 2012.
- Kloepfer KM, Lee WM, Pappas TE et al. Detection of pathogenic bacteria during rhinovirus infection is associated with increased respiratory symptoms and asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*, 133(5): 1301 – 1307, 2014.
- Knowles NJ, Hyypia T, King AM et al. 2012. Picornaviridae. *In*: King AM, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. (Eds.), Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, pp. 855–880, 2012.
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 348: 1953 – 1966, 2003.
- Kuehni CE, Spycher BD, Silverman M. Causal links between RSV infection and asthma: no clear answers to an old question. *Am J Respir Crit Care Med*, 179: 1079 – 1080, 2009.
- Kurai D, Saraya T, Ishii H et al. Virus-induced exacerbations in asthma and COPD. *Front Microbiol*, 4 (293): publicado online, 2013.
- Kwon JM, Shim JW, Kim DS et al. Prevalence of respiratory viral infection in children hospitalized for acute lower respiratory tract diseases, and association of rhinovirus and influenza virus with asthma exacerbations. *Korean J Pediatr*, 57 (1): 29 – 34, 2014.
- Laguna-Torres VA, Sanchez-Largaespada JF, Lorenzana I et al. Influenza and other respiratory viruses in three Central American countries. *Influenza Other Respir Viruses*, 5 (2): 123 – 134, 2011.
- Lam WY, Yeung ACM, Tang JW et al. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*, 45: 3631 – 3640, 2007.
- Lamb RA, Parks GD. Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication. *In*: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology, 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

- Lambert HP, Stern H. Infective factors in exacerbations of bronchitis and asthma. *BMJ*, 3: 323 – 327, 1972.
- Landry ML, Ferguson D. SimulFluor Respiratory Screen for Rapid Detection of Multiple Respiratory Viruses in Clinical Specimens by Immunofluorescence Staining. *J Clin Microbiol*, 38 (2): 708 – 711, 2000.
- Lau SK, Woo PC, Yip CC et al. Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *J Clin Microbiol*, 44: 2063 – 2071, 2006.
- Lee J, Storch GA. Characterization of Human Coronavirus-OC43 and HCoV-NL63 Infections among Hospitalized Children < 5 Years of Age. *Pediatr Infect Dis J*, ainda não publicado, 2014.
- Leekha S, Irish CL, Schneider SK et al. Viral detection using a multiplex polymerase chain reaction-based assay in outpatients with upper respiratory infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 75 (2): 169 – 173, 2013.
- Lenzi L, Mello AM, Silva LR et al. Influenza pandêmica A (H1N1) 2009: fatores de risco para o internamento\*. *J Bras Pneumol*, 38: 57 – 65, 2012.
- Leung TF, Chan PKS, Wong GWK et al. Respiratory viruses and atypical bacteria triggering severe asthma exacerbation in children. *Hong Kong Med J*, 19 (4): 11 –14, 2013.
- Leung TF, To MY, Yeung ACM, Wong YS et al. Multiplex molecular detection of respiratory pathogens in children with asthma exacerbation. *Chest*, 137 (2) : 348 - 54, 2010.
- Liu WK, Liu Q, Chen DH et al. Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC Infect Dis*, 13:28, 2013.
- Lofgren E, Fefferman NH, Naumov YN et al. Influenza seasonality: underlying causes and modeling theories. *J Virol*, 81: 5429 – 5436, 2007.
- Lopez-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B et al. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods*, 129: 1 – 7, 2005.
- Lowen AC, Mubareka S, Steel J et al. Influenza Virus Transmission is Dependent on Relative Humidity and Temperature. *PLoS Pathog*, 3 (10): publicado online, 2007.
- Lu QB, Wo Y, Wang LY et al. Molecular Epidemiology of Human Rhinovirus in Children with Acute Respiratory Diseases in Chongqing, China. *Sci Rep*, 4: 1 – 6, 2014.
- Lu Y, Wang S, Zhang L et al. Epidemiology of Human Respiratory Viruses in Children with Acute Respiratory Tract Infections in Jinan, China. *Clin Dev Immunol*, 2013: 1 – 8, 2013.
- Luytjes W, Bredenbeek PJ, Noten AFH et al. Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2: indications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus. *Virology*, 166: 415 – 422, 1988.
- Mahony JB. Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods. *Clin Microbiol Rev*, 21: 716 – 747, 2008.
- Malekshahi SS, Azad TM, Shahmahmoodi S et al. First Report of Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus Co-Infection in a 2-Year-Old Kawasaki Patient in Iran. *Iranian J Publ Health*, 39: 140 – 142, 2010.

- Mandelcwaig A, Moulin F, Menager C et al. Underestimation of Influenza Viral Infection in Childhood Asthma Exacerbations. *J Pediatr*, 157 (3): 505 – 506, 2010.
- Martinello RA, Chen MD, Weibel C et al. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis*, 186: 839 – 842, 2002.
- Martinez-Roig A, Salvado M, Caballero-Rabasco MA et al. Viral Coinfection in Childhood Respiratory Tract Infections. *Arch Bronconeumol*, 51 (1): 5 – 9, 2015.
- Masoli M, Fabian D, Holt S et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy*, 59: 469 – 478, 2004.
- Masters PS, Perlman S. Coronaviridae. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.
- Matsumoto K, Inoue H. Viral infections in asthma and COPD. *Respir Investig*, 52: 92 – 100, 2014.
- Mcdevitt J, Rudnick S, First M et al. Role of the absolute humidity in the inactivation of influenza viruses on stainless steel surfaces at elevated temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 76: 3943 – 3947, 2010.
- McErlean P, Greiman A, Favoreto S Jr et al. Viral diversity in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*, 30: 481 – 495, 2010.
- McIntosh K. A new virulent human coronavirus: how much does tissue culture tropism tell us? *J Infect Dis*, 207: 1630-1632, 2013.
- Memish ZA, Zumla AI, Al-Hakeem RF et al. Family cluster of Middle East respiratory syndrome coronavirus infections. *N Engl J Med*, 368: 2487 – 2494, 2013.
- Metzgar D, Osuna M, Kajon AE, et al. Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers. *J Infect Dis*, 196: 1465 – 1473, 2007.
- Meyer G, Deplanche M, Schelcher F. Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 31: 191 – 225, 2008.
- Minor TE, Dick EC, DeMeo AN et al. Viruses as precipitants of asthmatic attacks in children. *JAMA*, 227: 292 – 298, 1974.
- Miyaki C, Quintilio W, Miyaji EN et al. Production of H5N1 (NIBRG-14) inactivated whole virus and split virion influenza vaccines and analysis of immunogenicity in mice using different adjuvant formulations. *Vaccine*, 28: 2505 – 2509, 2010.
- Moore C, Hibbits S, Owen N et al. Development and evaluation of a real-time nucleic acid sequence based amplification assay for rapid detection of influenza A. *J Med Virol*, 74: 619 – 628, 2004.
- Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *N Engl J Med*, 361: 225 – 229, 2009.
- Moura FE, Perdigão AC, Siqueira MM. Seasonality of influenza in the tropics: a distinct pattern in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 81:180 – 183, 2009.
- Mufson MA, Orvell C, Rafnar B et al. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, 66: 2111 – 2124, 1985.

Nagayama Y et al. Bacterial colonization in respiratory secretions from acute and recurrent wheezing infants and children. *Pediatr Allergy Immunol*, 18: 110 – 117, 2007.

Nair H, Brooks WA, Katz M et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 378 (9807): 1917 – 1930, 2011.

NIH - National Asthma Education and Prevention Program, Expert Panel Report 3. 2007. Disponível em: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthsumm.pdf>

Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post transfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*, 241: 92 – 97, 1997.

Okiro EA, Ngama M, Bett A et al. Factors associated with increased risk of progression to respiratory syncytial virus-associated pneumonia in young Kenyan children. *Trop Med Int Health*, 13: 914 – 926, 2008.

Okiro EA, White JL, Ngama M et al. Duration of shedding of respiratory syncytial virus in a community study of Kenyan children. *BMC Infect Dis*, 10 (15): 1 – 7, 2010.

Ouedraogo S, Traore B, Bi ZABN et al. Viral Etiology of Respiratory Tract Infections in Children at the Pediatric Hospital in Ouagadougou (Burkina Faso). *PLoS One*, 9 (10): 1 – 7, 2014.

Ozcan C, Toyran M, Civelek E et al. Evaluation of Respiratory Viral Pathogens in Acute Asthma Exacerbations during Childhood. *J Asthma*, 48: 888 – 893, 2011.

Pallansch M, Oberste MS, Whitton JL. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

Palmenberg AC, Spiro D, Kuzmickas R et al. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science*, 324: 55 – 59, 2009.

Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen K-H et al. International Consensus on (icon) pediatric asthma. *Allergy*, 67: 976 – 997, 2012.

Papadopoulos NG, Papi A, Meyer J et al. Rhinovirus infection up-regulates eotaxin and eotaxin-2 expression in bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy*, 31: 1060 – 1066, 2001.

Papi A, Johnston SL. Rhinovirus infection induces expression of its own receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via increased NF- $\kappa$ B-mediated transcription. *J Biol Chem*, 274: 9707– 9720, 1999.

Parveen S, Sullender WM, Fowler K et al. Genetic variability in the G protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. *J Clin Microbiol*, 44: 3055 – 3064, 2006.

Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: Old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis*, 52: 284 – 289, 2011.

Peterson LR, Dalhoff A. Towards targeted prescribing: will the cure for antimicrobial resistance be specific, directed therapy through improved diagnostic testing? *J Antimicrob Chemother*, 53: 902 – 905, 2004.

Picornaviridae family. Enterovirus genus: 2012. Disponível em: <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>. Acesso em: 15 de jan, 2014.

Pierangeli A, Gentile M, Di Marco P et al. Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *J Med Virol*, 79: 163 – 168, 2007.

Popowitch EB, O'Neill SS, Miller MB. Comparison of the Biofire FilmArray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP fast multiplex assays for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*, 51: 1528 – 1533, 2013.

Pozo F, García-García ML, Calvo C et al. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol*, 40: 224 – 228, 2007.

Proenca-Modena JL, Valera FCP, Jacob MG et al. High rates of detection of respiratory viruses in tonsillar tissues from children with chronic adenotonsillar disease. *PLoS One*, 7: 1 – 11, 2012.

Puig M, Jofre J, Lucena F et al. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol*, 60: 2963 – 2970, 1994.

Pyrk K, Berkhout B, van der Hoek L. Identification of new human coronaviruses. *Expert review of anti-infective therapy*, 5: 245 – 253, 2007.

Pyrk K, Berkhout B, van der Hoek L. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virol*, 81: 3051 – 3057, 2006.

Pyrk K, Stosek K, Wojcik K et al. Use of Sensitive, Broad-Spectrum Molecular Assays and Human Airway Epithelium Cultures for Detection of Respiratory Pathogens. *PLoS One*, 7 (3): 1 – 11, 2012.

Rabie T, Curtis V. Handwashing and risk of respiratory infections: a quantitative systematic review. *Trop Med Int Health*, 11 (3): 258 – 267, 2006.

Racaniello, VR. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology, 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

Rand KH, Rampersaud H, Houck HJ. Comparison of two multiplex methods for detection of respiratory viruses: FilmArray RP and xTAG RVP. *J Clin Microbiol*, 49 (7): 2449 – 2453, 2011.

Rochat S, Komada H, Kolakofsky D. Loss of V protein expression in human parainfluenza virus type 1 is not a recent event. *Virus Res*, 24: 137 – 144, 1992.

Rodrigues OG, Rozov T, Silva EMK et al. Infecções virais em crianças portadoras de doença respiratória aguda, atendidas em um centro de saúde escola, em Belém, Pará, Brasil. *Pediatrics*, 26: 13 – 20, 2004.

Rohde G, Borg I, Arinir U, et al. Relevance of human metapneumovirus in exacerbations of COPD. *Respir Res*, 6: 150, 2005.

Roussy JF, Carbonneau J, Ouakki M et al. Human metapneumovirus viral load is an important risk factor for disease severity in young children. *J Clin Virol*, 60: 133 – 140, 2014.

Russel RJ, Kerry PS, Stevens DJ et al. Structure of influenza hemagglutinin in complex with NA inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci*, 105: 17736 – 17741, 2008.

Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC et al. Viral pneumonia. *Lancet*, 377: 1264 – 1275, 2011.

- Sajjan U, Wang Q, Zhao Y et al. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 178: 1271 – 1281, 2008.
- Sandrock CE, Norris A. Infection in Severe Asthma Exacerbations and Critical Asthma Syndrome. *Clinic Rev Allerg Immunol*, 48: 104 – 113, 2015.
- SBPT, B. S. O. P. A. P. Guidelines for the Management of Asthma. *The Brazilian Journal of Pneumology*, 38 (1): S1 - 46, 2012.
- Schaap-Nutt A, Scull MA, Schmidt AC et al. Growth restriction of an experimental live attenuated human parainfluenza virus type 2 vaccine in human ciliated airway epithelium in vitro parallels attenuation in African green monkeys. *Vaccine*, 28: 2788 – 2798, 2010.
- Schlaudecker EP, Heck JP, McIntyre ET et al. Etiology and Seasonality of Viral Respiratory Infections in Rural Honduran Children. *Pediatr Infect Dis J*, 31 (11): 1113 – 1118, 2012.
- Schomacker H, Schaap-Nutt A, Collins PL et al. Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. *Curr Opin Virol*, 2 (3): 294 – 299, 2012.
- Scott PD, Ochola R, Sande C et al. Comparison of strain-specific antibody responses during primary and secondary infections with respiratory syncytial virus. *J Med Virol*, 79: 1943–50, 2007.
- Seto D, Chodosh J, Brister JR et al. Using the whole-genome sequence to characterize and name human adenoviruses. *J Virol*, 85: 5701 – 5702, 2011.
- Shaw ML, Palese P. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.
- Sigurs N, Aljassim F, Kjellman B et al. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax*, 65: 1045 – 1052, 2010.
- Silva DR, Viana VP, Müller AM et al. Respiratory viral infections and effects of meteorological parameters and air pollution in adults with respiratory symptoms admitted to the emergency room. *Influenza Other Respir Viruses*, 8 (1): 42 – 52, 2013.
- Sloots TP, Whiley DM, Lambert SB et al. Emerging respiratory agents: New viruses for old diseases? *J Clin Virol*, 42: 233 – 243, 2008.
- Steil BP, Barton DJ. Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. *Virus Res*, 139: 240 – 252, 2009.
- Stelzer-Braid S, Oliver BG, Blazey AJ et al. Exhalation of Respiratory Viruses by Breathing, Coughing, and Talking. *J Med Virol*, 81: 1674 – 1679, 2009.
- Stirbulov R, Bernd LAG, Solé D. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *Rev bras alerg imunopatol*, 29 (5): 222 – 245, 2006.
- Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev*, 13: 1 – 15, 2000.
- Tabatabai J, Prifert C, Pfeil J et al. Novel Respiratory Syncytial Virus (RSV) Genotype ON1 Predominates in Germany during Winter Season 2012-13. *PLoS One*, 9 (10): 1 – 9, 2014.
- Talaat KR, Karron RA, Thumar B et al. Experimental Infection of Adults With Recombinant Wild-Type Human Metapneumovirus. *J Infect Dis*, 208: 1669 – 1677, 2013.

- Tan XQ, Zhao X, Lee VJ et al. Respiratory viral pathogens among Singapore military servicemen 2009 – 2012: epidemiology and clinical characteristics. *BMC Infect Dis*, 14 (204): 1 – 9, 2014.
- Tang JW, Lai FYL, Wong F et al. Incidence of common respiratory viral infections related to climate factors in hospitalized children in Hong Kong. *Epidemiol Infect*, 138: 225 – 235, 2010.
- Tang JW. The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J R Soc Interface*, 6: 737 – 746, 2009.
- Tapparel C, Cordey S, Junier T et al. Rhinovirus genome variation during chronic upper and lower respiratory tract infections. *PLoS One*, 6: publicado online, 2011.
- Tapparel C, Junier T, Gerlach D et al. New respiratory enterovirus and recombinant rhinoviruses among circulating picornaviruses. *Emerg Infect Dis*, 15: 719 – 726, 2009.
- Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ et al. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol*, 14: 282 – 293, 2013.
- Taubenberger JK, Baltimore D, Doherty PC et al. Reconstruction of the 1918 Influenza Virus: Unexpected Rewards from the Past. *M Bio*, 3 (5): publicado online, 2012.
- Teeratakulpisarn J, Pientong C, Ekalaksananan T et al. Rhinovirus infection in children hospitalized with acute bronchiolitis and its impact on subsequent wheezing or asthma: a comparison of etiologies. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 32 (3): 226 – 234, 2014.
- Tellier R. Aerosol transmission of influenza A virus: a review of new studies. *J R Soc Interface*, 6: 783 – 790, 2009.
- Tesse R, Pandey RC, Kabesch M. Genetic variations in toll-like receptor pathway genes influence asthma and atopy. *Allergy*, 66: 307 – 316, 2011.
- Thammawat S, Sadlon TA, Hallsworth PG et al. Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection. *J Virol*, 82: 11767 – 11774, 2008.
- Thangavel RR, Bouvier NM. Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission and immunology. *J Immunol Methods*, 410: 60 - 79, 2014.
- Thavagnanam S, Christie SN, Doherty GM et al. Respiratory viral infection in lower airways of asymptomatic children. *Acta Paediatr*, 99: 394 – 398, 2010.
- Thomas JK, Noppenberger J. Avian Influenza: A review. *Am J Health-Syst Pharm*, 64: 149 – 165, 2007.
- Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr*, 83 (5): 422 – 428, 2007.
- Tischer CG, Hohmann C, Thiering E et al. Meta-analysis of mould and dampness exposure on asthma and allergy in eight European birth cohorts: an ENRIECO initiative. *Allergy*, 66: 1570 – 1579, 2011.
- Tran DN, Pham TMH, Ha MT et al. Molecular Epidemiology and Disease Severity of Human Respiratory Syncytial Virus in Vietnam. *PLoS One*, 8 (1): 1 – 10, 2013.
- Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology. *Clin Microbiol Rev*, 23: 74 – 98, 2010.

- Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*, 310: 77 – 80, 2005.
- Tyrell DA, Bynoe ML. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet*, 1: 76 – 77, 1966.
- Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*, 7: 719 - 724, 2001.
- Van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis*, 10: 658 – 666, 2004.
- Van der Hoek L, Sure K, Ihorst G et al. Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med*, publicado online, 2005.
- Van Der Zalm MM, Van Ewijk BE, Wilbrink B et al. Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. *J Pediatr*, 154: 396 – 400, 2009.
- Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest*, 87 (9): 851 – 857, 2007.
- Vieira SE, Gilio AE, Miya CR et al. Infecção nosocomial pelo vírus respiratório sincicial em enfermaria de pediatria. *Pediatrics*, 24: 17 – 24, 2002.
- Walsh EE, Peterson DR, Kalkanoglu AE et al. Viral Shedding and Immune Responses to Respiratory Syncytial Virus Infection in Older Adults. *J Infect Dis*, 207: 1424 – 1432, 2013.
- Waner J. Parainfluenza viruses. In: P. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, DC, 2012.
- Wang JH, Kwon HJ, Jang YJ. Rhinovirus enhances various bacterial adhesions to nasal epithelial cells simultaneously. *Laryngoscope*, 119: 1406 – 1411, 2009.
- Wang K, Wang W, Yan H et al. Correlation between bocavirus infection and humoral response, and co-infection with other respiratory viruses in children with acute respiratory infection. *J Clin Virol*, 47: 148 – 155, 2010.
- Wark PAB, Tooze M, Powell H et al. Viral and bacterial infection in acute asthma and chronic obstructive pulmonary disease increases the risk of readmission. *Respirology*, 18: 996 – 1002, 2013.
- Webster RG, Govorkova EA. Continuing challenges in influenza. *Ann NY Acad Sci*, publicado online, 1 – 24, 2014.
- WHO – World Health Organization. *Mortality: Chronic respiratory diseases, deaths per 100.000. Data by country*. 2008. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.A866>. Acesso em 27 de mar, 2014.
- Williams JV, Crowe JE Jr, Enriquez R et al. Human metapneumovirus infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults. *J Infect Dis*, 192: 1149 – 1153, 2005.
- Winther B, Greve JM, Gwaltney JM Jr, et al. Surface expression of intercellular adhesion molecule 1 on epithelial cells in the human adenoid. *J Infect Dis*, 176:523–525, 1997.
- Wold WSM, Ison MG. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 5<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

- Wong SS, Yuen K. Avian influenza virus infections in human. *Chest*, 129:156-68, 2006.
- Woo PC, Lau SK, Tsoi HW. Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. *J Infect Dis*, 192: 1898 – 1907, 2005.
- Wozniak-Kosek A. Detection of Influenza and Other Respiratory Viruses Carried Out in the Influenza Project – Monitoring Vaccine Effectiveness (I-MOVE). *Adv Exp Med Biol*, 836: 29 – 33, 2015.
- Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.
- Yogo Y, Wimmer E. Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci*, 69: 1877 – 1882, 1972.
- Yusuf S, Piedimonte G, Auais A et al. The relationship of meteorological conditions to the epidemic activity of respiratory syncytial virus. *Epidemiol Infect*, 135: 1077 – 1090, 2007.
- Zhang L, Bukreyev A, Thompson CI et al. Infection of ciliated cells by human parainfluenza virus type 3 in an in vitro model of human airway epithelium. *J Virol*, 79: 1113 – 1124, 2005.
- Zhang L, Peeples ME, Boucher RC, et al. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol*, 76: 5654 – 5666, 2002.
- Zhu Z, Tang W, Gwaltney JM Jr et al. Rhinovirus stimulation of interleukin-8 in vivo and in vitro: role of NF-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 273: 814 – 824, 1997.

## **ANEXOS**

---

**Anexo 1 – Termo de consentimento Informado**

**Anexo 2 – Questionário**

## TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Seu filho está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Meu nome é Lusmaia Damaceno Camargo Costa, sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação é Pneumologia Pediátrica. Após ler com atenção este documento, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine em todas as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias e também será assinado por mim, em todas as folhas. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás - UFG, nos seguintes telefones: 3269. 8345 ou 3269 82.

Se você tiver qualquer dúvida sobre a ética da pesquisa e seus direitos como participante da pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa clínica (CEP) do Hospital das Clínicas da UFG, pelo telefone 3269 8338 ou 3269 8426, ou no endereço: Primeira Avenida, S/N, Setor Leste Universitário, Unidade de Pesquisa Clínica, 2º andar.

**INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA:** Trata-se de um estudo chamado “Vírus e bactérias atípicas em crianças asmáticas em exacerbação”, onde iremos pesquisar estes microorganismos nas secreções das narinas das crianças. Esse estudo é muito importante, pois vamos pesquisar um dos fatores que contribuem para que as crianças asmáticas entrem em crises fortes que necessitem de internação. Os vírus e as bactérias atípicas são comuns na população, muitas vezes causam simples resfriados. Porém podem causar até pneumonia e, nos casos de crianças que tem asma, podem causar crises fortes. Conhecendo melhor a frequência destes microorganismos nas crianças, poderemos tentar prevenir estas crises. Isso ajudará muitos médicos a diagnosticarem e melhor tratarem das doenças respiratórias. Portanto, a participação do seu filho pode ajudar os médicos a ajudarem muita gente.

O teste que seu filho irá realizar é chamado Aspirado Nasofaríngeo e consiste na instilação de uma pequena quantidade de soro fisiológico nas narinas através de uma pequena e fina sonda, seguida de aspiração de volta do soro. Esse procedimento será conduzido por pesquisador experiente, demora entre 10 e 15 minutos e não haverá risco significativo à saúde do seu filho, podendo ocorrer desconforto (um pouco maior do que o que ocorre quando você coloca soro no nariz) e, em raros casos pode ocorrer leve sangramento no local. Esse procedimento tem sido amplamente usado em vários locais do Brasil e do mundo para investigação de doenças pulmonares, e se tornou muito difundido após a epidemia do vírus H1N1, pois é um dos meios de detectar o vírus no organismo.

Vários vírus serão pesquisados neste exame. Além de nos ajudar a conhecer melhor o papel dos vírus como causa de crises de asma em crianças brasileiras, você poderá ter acesso ao exame, caso seja solicitado por escrito ao pesquisador. Caso o exame de seu filho esteja positivo para alguns dos vírus isso não irá interferir no tratamento, pois não há medicamentos para o tratamento dos vírus. Porém caso venha positivo para as bactérias atípicas, ele receberá o antibiótico específico. Caso tenha diagnóstico de asma e não faça acompanhamento médico, iremos encaminhá-lo ao ambulatório de pneumologia pediátrica mais acessível. Caso seja considerado asmático grave ele será atendido no ambulatório de Pneumologia pediátrica do Hospital das Clínicas da UFG. Gostaríamos de pedir que você concordasse, assinando esse documento para que seu filho participasse desse estudo. Garantimos **a total confidencialidade dos dados**, ou seja, seu filho não poderá ser identificado direta ou indiretamente por ninguém que seja estranho ao comitê de estudos. Você não vai gastar nada, nem terá que deslocar seu filho do seu local habitual, mas também não há qualquer ganho financeiro para participação no estudo. Todo o material utilizado em cada criança é descartável, não havendo, portanto, risco de

infecção decorrente do exame. A qualquer momento você pode desistir de participar, sem nenhum prejuízo para você ou para ele.

Nome e Assinatura do pesquisador

---

### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_  
CPF \_\_\_\_\_ nº de prontuário \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo que meu filho participe do estudo “ Vírus e bactérias atípicas em crianças asmáticas em exacerbação”, sob a responsabilidade da Dra. Lusmaia Damaceno Camargo Costa, como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação do meu filho/a. Estou convencido que ninguém terá acesso às informações do meu filho, e que ele não estará exposto a nenhum risco decorrente da realização do procedimento, exceto leve desconforto do exame ou excepcionalmente leve sangramento. Foi-me garantido que posso não concordar que meu filho participe da pesquisa, ou que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do tratamento dele/dela neste Hospital.

Local e data \_\_\_\_\_

Nome do responsável pela criança: \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável pela criança: \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

---

### TERMO DE ASSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_ aceito participar da pesquisa “Vírus e bactérias atípicas em crianças asmáticas em exacerbação”. Declaro que os pesquisadores me explicaram como vai ser realizado o exame, que consiste em introduzir uma fina sonda em minha narina, instilar um pouco de soro fisiológico e aspirar de volta o mesmo soro. Explicaram-me que esse procedimento demora entre 15 e 20 minutos e não haverá nenhum prejuízo para mim, além de um leve desconforto, e raramente leve sangramento. Compreendo que não sou obrigado a participar da pesquisa, eu decido se quero participar ou não. Dessa forma, concordo livremente em participar desta pesquisa sabendo que posso desistir a qualquer momento.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Nome do sujeito da pesquisa: \_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito da pesquisa: \_\_\_\_\_

## QUESTIONÁRIO PROVIR

Asmático crise( ) Asmático estável( ) IVAs( )

|                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nome da criança:                                                                         |
| SEXO:<br>1.( ) Masculino 2.( ) Feminino                                                  |
| Nome do acompanhante:                                                                    |
| QUAL O GRAU DE PARENTESCO DO ACOMPANHANTE?<br>1.( ) Mãe 2.( ) Pai 3.( ) Avós 4.( ) Outro |
| Data de nascimento: / /20                                                                |
| Idade (Anos):                                                                            |
| ENDEREÇO:                                                                                |
| Tipo Logradouro: Nome logradouro:                                                        |
| Quadra: Lote: Nº: Bairro: Complemento:                                                   |
| Telefone:                                                                                |

## DADOS DEMOGRÁFICOS

|                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| QUAL A COR OU RAÇA DA CRIANÇA?<br>1.( ) Branca 2.( ) Negra 3.( ) Amarela 4.( ) Parda 5.( ) Indígena                                      |
| QUAL A ESCOLARIDADE DA MÃE?<br>1.( ) Analfabeta 2.( ) Até 5ª série 3.( ) 6-8ª série 4.( ) 2º grau 5.( ) superior 6.( ) Ignorado/Não sabe |
| QUAL A ESCOLARIDADE DO PAI?<br>1.( ) Analfabeto 2.( ) Até 5ª série 3.( ) 6-8ª série 4.( ) 2º grau 5.( ) superior 6.( ) Ignorado/Não sabe |
| QUAL A RENDA FAMILIAR (SALÁRIOS MÍNIMOS)?<br>1.( ) Menor que um salário 2.( ) Entre um e dois salários 3.( ) Maior que dois salários     |

## DADOS CLÍNICOS

|                                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| UM DOS PAIS OU OS DOIS É FUMANTE?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) Ignorado/Não sabe                                                          |
| A CRIANÇA TEM CONTATO COM OUTROS FUMANTES EM CASA?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) Ignorado/Não sabe                                         |
| A CRIANÇA FREQUENTA BERÇÁRIO/CRECHE?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) Ignorado/Não sabe 4.( ) NA * (apenas para menores de 5 anos)            |
| ESTA CRIANÇA TEM ALGUMA DOENÇA CRÔNICA?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) Ignorado/Não sabe                                                    |
| Se a criança tem alguma doença crônica qual o nome?                                                                                       |
| A CRIANÇA RECEBEU VACINA CONTRA GRIPE NOS ÚLTIMOS 12 MESES?<br>1.( ) Nenhuma dose 2.( ) Uma dose 3.( ) Duas doses 4.( ) Ignorado/Não sabe |

## DADOS CLÍNICOS

|                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A criança está doente hoje? 1.( ) Sim 2.( ) Não                                                                                          |
| *Caso a criança que não esteja doente hoje marque NA nas perguntas abaixo:                                                               |
| HÁ QUANTOS DIAS OS SINTOMAS INICIARAM?<br>1.( ) 1 dia 2.( ) 2 dias 3.( ) 3 dias 4.( ) 4 dias 5.( ) 5 dias 6.( ) Mais que 5 dias 7.( ) NA |
| TEVE FEBRE?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) NA                                                                                              |
| FEBRE HÁ QUANTOS DIAS?<br>1.( ) Menos 3 dias 2.( ) Mais que 3 dias 3.( ) NA                                                              |
| TEVE TOSSE?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) NA                                                                                              |
| TEVE CORIZA?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) NA                                                                                             |
| TEVE DOR NO CORPO?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) NA                                                                                       |
| TEVE DOR DE GARGANTA?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) NA                                                                                    |
| TEVE DIARRÉIA?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) NA                                                                                           |

## CONDUTA/EVOLUÇÃO

|                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.( ) Tratamento domiciliar 2.( ) Observação 3.( ) Internação 4.( ) Internação em UTI |
|---------------------------------------------------------------------------------------|

## DADOS DO PRONTUÁRIO

\*Preencher os itens abaixo caso a criança esteja internada ou em observação pelo quadro atual

|                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Saturação *(Admissão): O2: FR:                                                                                                         |
| Saturação *(No momento da avaliação): O2: FR:                                                                                          |
| TEMPO DE INTERNAÇÃO ou OBSERVAÇÃO*(no momento da avaliação):<br>1.( ) Menos que 6hs 2.( ) 6-12hs 3.( ) 12-18hs 4.( ) 18-24hrs 5.( ) NA |
| USO DE OXIGÊNIO EM ALGUM MOMENTO?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) NA                                                                      |
| SE RESPOSTA FOR SIM PARA USO DE OXIGÊNIO EM ALGUM MOMENTO?<br>1.( ) nasal 2.( ) máscara 3.( ) TOT 4.( ) NA                             |
| USO DE CORTICOIDE ENDOVENOSO?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) NA                                                                          |
| USO DE BRONCODILATADORES?<br>1.( ) Sim 2.( ) Não 3.( ) NA                                                                              |
| Se sim, qual a frequência do uso de broncodilatadores: / horas                                                                         |

|                                    |
|------------------------------------|
| USO DE ANTIBIÓTICOS?               |
| 1.( ) Sim    2.( ) Não    3.( ) NA |
| RADIOGRAFIA DE TÓRAX?              |
| 1.( ) Sim    2.( ) Não    3.( ) NA |
| DIAGNÓSTICO DE PNEUMONIA?          |
| 1.( ) Sim    2.( ) Não    3.( ) NA |
| Outras informações:                |

#### HISTÓRIA CLÍNICA (ASMA)

*\*Se está criança **NÃO** possui asma marque **NA** nas repostas abaixo:*

|                                                                                      |                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SITUAÇÃO DA ASMA DA CRIANÇA HOJE:                                                    | 1.( ) Em crise    2.( ) Controlada    3.( ) NA                                                                                                                                                          |
| SE ASMA CONTROLADA, ANOTAR:                                                          | 1. Valor do TCA: ( )    2. Valor do PFE % ( )    3. Valor do VEF1 ( )                                                                                                                                   |
| Quantas vezes teve que consultar a criança por causa de crise de asma no último ano? | 1.( ) 1 vez    2.( ) duas vezes    3.( ) três ou mais vezes    4.( ) NA                                                                                                                                 |
| Internou por asma este ano?                                                          | 1.( ) Sim, uma vez    2.( ) Sim, 2 vezes    3.( ) Sim, 3 ou mais vezes    4.( ) Não                                                                                                                     |
| TEM TOSSE OU FALTA DE AR DURANTE EXERCÍCIOS FÍSICOS FORA DAS CRISES?                 | 1.( ) Sim    2.( ) Não    3.( ) NA                                                                                                                                                                      |
| TEM TOSSE NOTURNA FORA DAS CRISES?                                                   | 1.( ) Sim    2.( ) Não    3.( ) NA                                                                                                                                                                      |
| A CRIANÇA FAZ ALGUM TRATAMENTO PARA A ASMA?                                          | 1.( ) Sim    2.( ) Nunca    3.( ) Teve alta    4.( ) Abandonou    5.( ) NA                                                                                                                              |
| SE A RESPOSTA FOI SIM, ONDE O TRATAMENTO É REALIZADO?                                | 1.( ) Público    2.( ) Privado    3.( ) NA                                                                                                                                                              |
| QUAL A ESPECIALIDADE DO MÉDICO QUE TRATA A ASMA DA CRIANÇA?                          | 1.( ) Pediatra    2.( ) Pneumopediatra    3.( ) Pneumologista    4.( ) Emergencista    5.( ) NA                                                                                                         |
| A CRIANÇA USA MEDICAMENTO INTERCRISE (todos os dias, para prevenir crises)?          | 1.( ) Sim    2.( ) Não    3.( ) NA                                                                                                                                                                      |
| COMO É A ADESÃO?                                                                     | 1.( ) Nunca esquece de tomar    2.( ) Esquece às vezes    3.( ) Esquece a maioria das vezes    3.( ) Quase nunca toma    3.( ) NA                                                                       |
| A CRIANÇA UTILIZA CORRETAMENTE OS MEDICAMENTOS- TÉCNICA?                             | 1.( ) Sim    2.( ) Não    3.( ) NA                                                                                                                                                                      |
| SE A CRIANÇA USA MEDICAMENTO INTERCRISE:                                             | 1.( ) corticoide inalatório<br>2.( ) corticoide inalatório + broncodilatador de longa ação<br>3.( ) antagonista de leucotrieno<br>4.( ) homeopatia<br>5.( ) Outro Especifique o nome: _____<br>6.( ) NA |
| COMO A CRIANÇA ADQUIRE OS MEDICAMENTOS QUE UTILIZA?                                  | 1.( ) recursos próprios<br>2.( ) rede pública Goiânia<br>3.( ) rede pública outro município<br>4.( ) rede pública Estado                                                                                |
| COMO A CRIANÇA ADQUIRE OS MEDICAMENTOS QUE UTILIZA?                                  | 1.( ) recursos próprios<br>2.( ) rede pública Goiânia<br>3.( ) rede pública outro município<br>4.( ) rede pública Estado                                                                                |
| A CRIANÇA TEM CONTATO EM CASA COM ANIMAIS DE PELO?                                   | 1.( ) Sim    2.( ) Não    3.( ) NA                                                                                                                                                                      |
| A CRIANÇA TEM CONTATO EM CASA COM ANIMAIS DE PENA?                                   | 1.( ) Sim    2.( ) Não    3.( ) NA                                                                                                                                                                      |
| A CRIANÇA TEM CONTATO EM CASA COM MOFO?                                              | 1.( ) Sim    2.( ) Não    3.( ) NA                                                                                                                                                                      |
| A CRIANÇA TEM CONTATO EM CASA COM POEIRA?                                            | 1.( ) Sim    2.( ) Não    3.( ) NA                                                                                                                                                                      |

|                              |                     |
|------------------------------|---------------------|
| ASSINATURA DO ENTREVISTADOR: | Data:    /    /2013 |
|------------------------------|---------------------|