

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

***“Sibilância Recorrente após Bronquiolite Viral Aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório”***

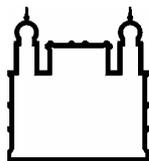
*por*

***Rita Elizabeth Checon de Freitas Silva***

*Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública.*

*Orientador principal: Prof. Dr. Francisco Inácio Pinkusfeld Monteiro Bastos  
Segunda orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira*

*Rio de Janeiro, julho de 2007.*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA

SERGIO AROUCA

ENSP

*Esta tese, intitulada*

***“Sibilância Recorrente após Bronquiolite Viral Aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório”***

*apresentada por*

***Rita Elizabeth Checon de Freitas Silva***

*foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:*

Prof. Dr. Clemax Couto Sant’Anna

Prof. Dr. Otávio Augusto Leite Cintra

Prof. Dr. Luiz Antonio Bastos Camacho

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria do Carmo Leal

Prof. Dr. Francisco Inácio Pinkusfeld Monteiro Bastos – Orientador

Catálogo na fonte  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica  
Biblioteca de Saúde Pública

S586s Silva, Rita Elizabeth Checon de Freitas  
Sibilância recorrente após bronquiolite viral aguda pelo vírus sincicial respiratório. / Rita Elizabeth Checon de Freitas Silva. Rio de Janeiro : s.n., 2007.  
104 p.

Orientador: Bastos, Francisco Inácio Pinkusfeld Monteiro  
Siqueira, Marilda Agudo Mendonça Teixeira de  
Tese de Doutorado apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca.

1.Vírus sincicial respiratório-isolamento & purificação.  
2.Bronquiolite viral-epidemiologia. 3.Bronquiolite viral-etologia.  
4.Sons respiratórios-etologia. 5.Incidência. 6.Lactente. 7.Fatores de risco. 8.Questionários. I.Título.

CDD - 22.ed. – 616.234

**Fazer uma tese significa, pois, aprender a por ordem nas próprias idéias e ordenar os dados: é uma experiência de trabalho metódico; quer dizer, construir um “objeto” que, como princípio, possa também servir aos outros.**

**Umberto Eco**

**Às crianças participantes deste estudo**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Francisco Inácio Bastos pela disponibilidade e atenção dispensada durante todos estes anos de doutorado. Obrigada pela paciência, palavras de incentivo e importantes ensinamentos durante todo este trabalho.

À minha co-orientadora, Marilda M. Siqueira. Obrigada por sua orientação neste trabalho, amizade e companheirismo ao longo destes anos e por promover condições para o treinamento de pessoal no desenvolvimento das técnicas de biologia molecular.

A Valeska Andreozzi, por sua fundamental participação na análise estatística dos dados. Obrigada pela atenção dispensada! Mesmo “do outro lado do oceano” não mediu esforços para ajudar na análise e discussão dos resultados deste trabalho.

A Rômulo Goronci Sant’Ana, pela realização das técnicas de biologia molecular utilizadas neste estudo. Obrigada por sua amizade, dedicação e entusiasmo com a pesquisa, revelados em bons anos de trabalho juntos.

A Liliana Cruz Spano, farmacêutica responsável pelo desenvolvimento das técnicas de biologia molecular. Obrigada por sua colaboração neste estudo, na orientação dos trabalhos laboratoriais e discussão dos resultados.

A João Maurício Sant’Ana e Roberta Daros, pela realização dos procedimentos laboratoriais utilizados neste estudo, sempre com muita responsabilidade e disciplina.

A todo o pessoal do NDI na pessoa de seu coordenador Reynaldo Dietze, pelas condições de trabalho que tornaram possíveis a realização deste estudo e a Rodrigo Ribeiro Rodrigues pelo livre acesso aos laboratórios e equipamentos sob sua responsabilidade.

A Eliseu Soares Rangel que me guiou por ruas de nossa região, nas visitas domiciliares aos pacientes, sempre com tanto carinho, atenção e paciência.

A Danieli Corsini Amorim que me ajudou na coleta de espécime clínico com grande empenho e dedicação a este trabalho.

A toda equipe médica do Pronto-Socorro e Sala de Emergência do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória pelo envio de pacientes para a coleta de espécime clínico. Obrigada pela amizade e pelo carinho com que me acolheram neste hospital e pela ajuda na seleção dos pacientes.

A Silvana Portes e Paulo Stephens do Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Oswaldo Cruz, pelo treinamento das técnicas de biologia molecular.

A Cynthia Braga da Cunha por sua colaboração com os pacotes estatísticos.

A Carolina Strauss por sua ajuda na coleta de dados dos prontuários médicos dos pacientes hospitalizados. Obrigada pela amizade, carinho e atenção com este estudo.

Ao Departamento de Pediatria do Centro de Ciências da Saúde da UFES por ter concedido minha liberação de atividades de docência para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, pediatras da Babyclin e às secretárias Silvane e Marilene. Obrigada pela amizade, cooperação e compreensão durante todos estes anos de doutorado.

Às “meninas” do Laboratório de Virologia do NDI, Christiane, Débora, Ketene e Luciana pelo convívio destes anos, tornando este espaço de trabalho um ambiente agradável, de muita cooperação e amizade.

Ao Fundo de Apoio a Ciência e Tecnologia (FACITEC) da Prefeitura Municipal de Vitória e Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (FAPES) do Governo do Estado do ES pelo apoio financeiro a este estudo.

**Um agradecimento especial aos meus filhos Gabriel e Sofia e ao meu marido Francisco pelo apoio, incentivo, paciência e cumplicidade com que dividiram todos estes anos de doutorado.**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Modelo do Vírus Sincicial Respiratório, ilustrando o nucleocapsídeo viral envolto por um envelope lipoprotéico e as proteínas de superfície F e G	13
<b>Gráfico 1</b>	Distribuição temporal dos casos de bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, Vitória, Espírito Santo, 2004/5	40
<b>Gráfico 2</b>	Distribuição por idade, de 76 crianças menores de um ano, com diagnóstico de bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, Vitória, Espírito Santo, 2004/5	42
<b>Gráfico 3</b>	Perfil cronológico do seguimento de cada criança no estudo, no período de abril de 2004 a outubro de 2006, Vitória, Espírito Santo	44
<b>Tabela 1</b>	Vírus respiratórios identificados em 166 crianças menores de 12 meses de idade com bronquiolite viral aguda, Vitória, Espírito Santo, 2004/5	39
<b>Tabela 2</b>	Características da amostra de 76 crianças com diagnóstico de bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, acompanhadas no estudo longitudinal, Vitória, Espírito Santo, 2004/5	43
<b>Tabela 3</b>	Análise bivariada para sibilância recorrente após bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, Vitória, Espírito Santo, 2004/6	47
<b>Tabela 4</b>	Análise multivariada para sibilância recorrente após bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, Vitória, Espírito Santo, 2004/6	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	<i>Bovine Albumin Fraction V</i>
BVA	Bronquiolite Viral Aguda
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> (Cadeia complementar de DNA)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
dNTP	Deoxinucleotídeo Trifosfato
DTT	Dithiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetraacético)
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
EUA	Estados Unidos da América
F	Glicoproteína F (Fusão)
FC	Frequência cardíaca
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FR	Frequência respiratória
G	Glicoproteína G
HCl	Ácido Clorídrico
HINSG	Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória
hMPV	<i>human Metapneumovirus</i> (Metapneumovirus humano)
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IRA	Infecções Respiratórias Agudas
IRATI	Infecções Respiratórias Agudas do Trato Inferior
KCl	Cloreto de Potássio
L	Polimerase viral
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>

M	Proteína de Matriz
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
N	Nucleoproteína
NDI	Núcleo de Doenças Infecciosas
NS	<i>Nonstructural Protein</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
P	Fosfoproteína
pb	Pares de bases
PBS	Tampão Salina Fosfato
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia pela Polimerase)
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucléico)
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-PCR</i> (Transcrição Reversa - Reação em Cadeia pela Polimerase)
RT-snPCR	RT-PCR seguida por snPCR
SH	<i>Small Hydrophobic Protein</i>
SNF	Secreção de nasofaringe
snPCR	<i>Semi-nested PCR</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SR	Sibilância Recorrente
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
Th1	<i>T-helper</i> tipo 1
Th2	<i>T-helper</i> tipo 2
U	Unidade
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
VSR	Vírus Sincicial Respiratório

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1 O Vírus Sincicial Respiratório</b> .....	16
<b>1.2 A Bronquiolite Viral Aguda</b> .....	21
<b>1.3 Sibilância Recorrente</b> .....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	31
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	31
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	31
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	33
<b>3.1 Descrição do estudo</b> .....	33
<b>3.2 Coleta de dados</b> .....	34
<b>3.2.1 Coleta de amostras biológicas</b> .....	34
<b>3.2.2 Entrevista com o responsável pela criança</b> .....	34
<b>3.2.3 Seguimento das crianças</b> .....	35
<b>3.3 Métodos laboratoriais</b> .....	36
<b>3.4 Mensuração da variável-desfecho</b> .....	37
<b>3.5 Mensuração das co-variáveis: história familiar de asma ou atopia</b> .....	38
<b>3.6 Análise estatística</b> .....	39
<b>3.7 Termo de consentimento livre e esclarecido</b> .....	40
<b>4. RESULTADOS</b> .....	42
<b>4.1 Diagnóstico virológico</b> .....	42
<b>4.2 Distribuição temporal do VSR</b> .....	43
<b>4.3 Resultados do estudo longitudinal</b> .....	44
<b>4.3.1 Caracterização da amostra</b> .....	44
<b>4.3.2 Perfil cronológico do seguimento dos pacientes</b> .....	47
<b>4.3.3 Hospitalização do paciente durante o acompanhamento</b> .....	48
<b>4.3.4 Taxa de incidência de sibilância recorrente</b> .....	48
<b>4.3.5 Análise bivariada</b> .....	48
<b>4.3.6 Análise Multivariada</b> .....	50
<b>4.4 Caracterização das perdas de seguimento</b> .....	52
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>5.1 Aspectos gerais do estudo</b> .....	55
<b>5.2 Diagnóstico laboratorial e prevalência viral</b> .....	57
<b>5.3 Distribuição temporal do VSR</b> .....	59
<b>5.4 Caracterização da amostra</b> .....	60
<b>5.5 Estudo longitudinal</b> .....	64
<b>5.5.1 Taxa de incidência de sibilância recorrente</b> .....	64
<b>5.5.2 Análise dos fatores de risco para sibilância recorrente</b> .....	67
<b>5.6 Limitações do estudo</b> .....	71
<b>5.7 Contribuições do estudo</b> .....	71
<b>6. CONCLUSÕES:</b> .....	74
<b>ANEXO 1</b> .....	77
<b>ANEXO 2</b> .....	78
<b>ANEXO 3</b> .....	81
<b>ANEXO 4</b> .....	83
<b>ANEXO 5</b> .....	85
<b>ANEXO 6</b> .....	89
<b>ANEXO 7</b> .....	90
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	92

## RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório é considerado o principal agente etiológico das infecções respiratórias agudas do trato inferior em crianças menores de dois anos de idade, sendo a bronquiolite viral aguda a principal delas. Além de causar uma elevada morbidade na fase aguda, a bronquiolite pelo Vírus Sincicial Respiratório tem sido associada a problemas respiratórios em longo prazo, especialmente, a sibilância recorrente.

Este estudo teve como objetivos determinar a taxa de incidência de sibilância recorrente após um quadro de bronquiolite pelo Vírus Sincicial Respiratório em uma amostra de crianças menores de um ano atendidas em Pronto-Socorro e sua eventual associação com diferentes fatores de risco. A análise dos dados foi realizada por meio do modelo linear generalizado com distribuição de Poisson e função de ligação logarítmica.

Setenta e seis crianças foram acompanhadas, por um período de dois anos e meio. A mediana da idade foi de um mês e meio; 58% eram pacientes do sexo masculino; em 68% dos casos havia um familiar com infecção respiratória aguda no domicílio; 91% das mães não fumaram na gravidez e em 35,5% dos casos havia um familiar fumante no domicílio. A média de anos de escolaridade para pai e mãe foi de oito anos; havia em média cinco habitantes por domicílio e três pessoas dividindo o mesmo quarto de dormir do paciente. Sessenta e dois por cento dos pacientes foram hospitalizados durante a bronquiolite. As taxas de incidência de sibilância recorrente bruta e ajustada foram de 3,7 e 3,6 episódios criança-ano respectivamente. As variáveis analisadas como potenciais fatores de risco foram: idade e sexo do paciente, hospitalização à época da bronquiolite, história familiar de asma e de atopia. Na análise multivariada somente sexo e história familiar de asma se mostraram independentemente associados ao desfecho. A taxa de incidência de sibilância recorrente foi 37% maior nas meninas e 41% maior em pacientes com história familiar de asma. Conclusão: Este é o primeiro estudo brasileiro e o terceiro do mundo em desenvolvimento sobre este assunto e mostrou uma importante morbidade respiratória de crianças após um quadro de bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório.

**Palavras-chave: Vírus Sincicial Respiratório; Bronquiolite Viral Aguda; Sibilância Recorrente**

## ABSTRACT

Respiratory Syncytial Virus is the most important cause of lower respiratory tract infection in children younger than two years old. Acute viral bronchiolitis is the most relevant clinical manifestation of the Respiratory Syncytial Virus infection, with a high morbidity in the acute phase and long-term respiratory problems, especially, recurrent wheezing.

The aims of this study are to determine the incidence rate of recurrent wheezing after Respiratory Syncytial Virus bronchiolitis in children below 12 months of age, attending Emergency Rooms and to explore the putative associations with different risk factors. The statistical analysis was performed using a generalized linear model, under the Poisson distribution and linked with a logarithmic function.

Seventy six children were followed during two years and a half. The median age was a month and a half; 58% were boys; in 68% of the cases there was a person with acute respiratory infection in the family; 91% of the mothers did not smoke during pregnancy and in 35.5% of the cases there were a passive smoker in the family. Parents schooling had an average of eight years of attendance; there were five household members and three persons sharing the patient bedroom, in average. Sixty-two percent of the patients were hospitalized in the acute phase of the bronchiolitis.

The crude and adjusted incidence rates of recurrent wheezing were 3.7 and 3.6 episodes child-year respectively. Different risk factors for recurrent wheezing were assessed, including age, gender, hospitalized treatment during bronchiolitis, parental history of asthma and atopy. In the multivariate analysis only gender and parental history of asthma were independently associated to recurrent wheezing. The incidence rate of post-bronchiolitis recurrent wheezing was 37% higher among female (versus male) babies and 41% higher in children with a parental history of asthma. Conclusion: This is the first Brazilian study and the third among developing nations addressing this question, evidencing the great concern related to respiratory morbidity in children after Respiratory Syncytial Virus bronchiolitis.

**Key-word: Respiratory Syncytial Virus; Acute Viral Bronchiolitis; Recurrent Wheezing**

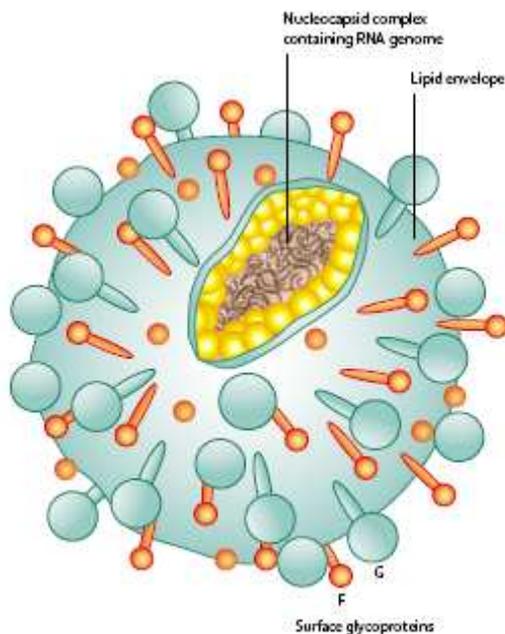
## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

As Infecções Respiratórias Agudas do Trato Inferior (IRATI) representam importantes enfermidades, que afetam a saúde das crianças em todo o mundo. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que cerca de 20% de todas as mortes de crianças até cinco anos de idade que ocorrem, em todo o mundo, são decorrentes destas doenças, incluindo a pneumonia, a bronquiolite e a bronquite <sup>1</sup>. Estas afecções têm especial relevância nos países em desenvolvimento. Dados da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) revelam que 29% das hospitalizações e 49% das consultas em menores de cinco anos de idade, na região das Américas, são decorrentes de infecções respiratórias agudas <sup>2</sup>.

Dentre os agentes etiológicos destes quadros respiratórios destacam-se os vírus e as bactérias. Estudos epidemiológicos evidenciam que, dentre os vírus associados a quadros respiratórios, o mais frequentemente identificado nos casos de IRATI é o Vírus Sincicial Respiratório (VSR) <sup>3-5</sup>. Este vírus é considerado o patógeno mais importante nas infecções respiratórias agudas nas crianças menores de dois anos de idade <sup>6,7</sup>.

### 1.1 O Vírus Sincicial Respiratório



**Figura 1. Modelo do Vírus Sincicial Respiratório, ilustrando o nucleocapsídeo viral envolto por um envelope lipoprotéico e as proteínas de superfície F e G <sup>8</sup>**

O VSR foi descrito pela primeira vez em 1956<sup>9</sup>. Trata-se de um vírus RNA, de fita única e polaridade negativa, com 15.222 nucleotídeos, envelopado, pertencente à família *Paramyxoviridae* e ao gênero *Pneumovirus*<sup>10</sup>. Seu genoma contém 10 genes que codificam onze proteínas: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 e L<sup>11</sup>. As proteínas de superfície, F e G são as mais importantes do ponto de vista da fisiopatologia da infecção pelo VSR, por induzirem a resposta imunitária do hospedeiro. A proteína G promove a ligação entre o vírus e a célula do hospedeiro, enquanto a proteína F está associada à fusão da membrana celular com o envelope viral (Figura 1). A proteína F estimula a resposta humoral e celular, citotóxica. A proteína G é reconhecida por anticorpos neutralizantes, mas não induz resposta citotóxica relevante<sup>12</sup>.

Dois grupos distintos de VSR, A e B, foram identificados a partir de reações com anticorpos monoclonais<sup>13,14</sup> e, posteriormente com análise genômica<sup>15</sup>. Os grupos A e B diferem entre si, principalmente em relação à proteína G, com variabilidade em torno de 50% na seqüência de aminoácidos<sup>11,12</sup>. Variabilidade antigênica e genômica também têm sido observadas no âmbito de cada grupo. Estas variações também ocorrem principalmente em relação à proteína G<sup>16,17</sup>.

Com relação à epidemiologia do VSR, dois aspectos são especialmente relevantes: a sua sazonalidade e a sua capacidade de produzir infecções subseqüentes, em um mesmo indivíduo.

O VSR tem uma ampla distribuição mundial, já tendo sido descrito em várias partes do mundo, em diferentes contextos e condições climáticas. Os padrões de sazonalidade, a(s) época(s) do ano e a duração dos surtos epidêmicos causados por este vírus são questões em debate e ainda não totalmente compreendidas. Em países de clima temperado, as epidemias são, habitualmente, anuais, nos meses de inverno, chegando até a primavera<sup>18</sup>. É descrito também, na Finlândia, um padrão bianual de epidemias, com um grande pico de ocorrência do VSR nos meses de inverno e um de menores proporções durante a primavera<sup>19</sup>. Já nas regiões de clima tropical, os episódios epidêmicos parecem ocorrer nas estações chuvosas<sup>5</sup>.

No Brasil, com sua grande diversidade climática, não há um padrão definido, com resultados contrastantes nas diferentes publicações. Somente na região sul do país, de clima

temperado, as epidemias de VSR têm sido relatadas nos meses de inverno<sup>20</sup>. Em Fortaleza, Ceará, região nordeste do país, de clima tropical, as infecções pelo VSR se mostram associadas a períodos chuvosos, com os primeiros casos ocorrendo em janeiro ou fevereiro e os últimos em julho ou agosto<sup>21</sup>. No sudeste do país, nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo, as epidemias do VSR têm sido relatadas no outono, com início no final do mês de março/início de abril, se estendendo por um período de cinco meses<sup>22,23</sup>. Em Vitória, Espírito Santo, também região sudeste do país, no nosso estudo realizado por um período de 12 meses, o VSR foi identificado ao longo de 10 meses, porém com um pico de ocorrência do final do verão até meados do outono (fevereiro a maio)<sup>24</sup>.

Uma característica importante observada nestas epidemias, em várias partes do mundo, é a circulação simultânea dos dois grupos do VSR. Anderson et al.<sup>14</sup> relataram que estes referidos grupos já existiam há cerca de 20 anos antes do estudo, com a co-circulação de ambos os grupos durante uma mesma epidemia.

Painéis de estudos seccionais seriados têm evidenciado uma alternância entre os grupos em relação à predominância em diferentes epidemias, porém, com maior frequência de predominância para o grupo A<sup>19,25-28</sup>. Um estudo que analisou 10 períodos epidêmicos (1978 a 1988) registrou, em apenas uma epidemia, o predomínio do grupo B<sup>29</sup>. Em Rochester, Nova York, EUA, ao longo de 15 anos de estudo, em nove surtos epidêmicos o grupo A foi predominante, em quatro foram observadas proporções similares de vírus dos dois grupos e em dois o grupo B foi predominante<sup>26</sup>.

Observa-se maior variabilidade genética dentro do grupo A do que no grupo B, o que explicaria a predominância do grupo A nas epidemias<sup>30</sup>. Estes autores analisaram três períodos epidêmicos do VSR, e, em dois, o grupo A foi dominante, ainda que com cepas geneticamente distintas. Esta variabilidade foi evidenciada também com relação ao grupo B, porém em menor escala. Esta limitada variabilidade do grupo B contribuiria para uma menor disseminação destas cepas e predominância do grupo A. Outra possível explicação para o predomínio do grupo A seria a diferença entre os dois grupos, no que se refere à imunidade cruzada. Muelenaer et al.<sup>31</sup> mostraram que crianças que tiveram infecção primária por VSR do grupo A apresentavam níveis elevados de anticorpos neutralizantes contra cepas de VSR do grupo B, enquanto que, quando a infecção primária era pelo VSR do grupo B, níveis mais baixos de anticorpos neutralizantes contra cepas do grupo A foram encontrados.

Diferentes genótipos, tanto do grupo A quanto de B, podem co-circular numa mesma epidemia, em uma comunidade, e genótipos similares são habitualmente identificados em regiões geograficamente distantes<sup>32,33</sup>. Análises filogenéticas de ambos os grupos revelam um padrão de evolução semelhante ao vírus influenza B, com várias linhagens coexistindo numa mesma epidemia, com seleção positiva de novas variantes em função da resposta imune do hospedeiro. Além disto, novos genótipos do VSR se disseminam assim que surgem, com uma variação temporal mais pronunciada do que a variabilidade geográfica<sup>34</sup>.

Outro aspecto que merece destaque na epidemiologia do VSR é a ocorrência de repetidas infecções, em todas as faixas etárias<sup>18</sup>. A imunidade a re-infecções é adquirida gradualmente. Um importante estudo sobre epidemiologia do VSR mostrou que a taxa de ataque para primo-infecção era de 98%, com 75% na segunda infecção, e 65% na terceira<sup>35</sup>. Diferenças antigênicas entre cepas do VSR (dentro e entre os grupos) podem contribuir para a habilidade deste vírus em promover infecção na presença de imunidade pré-existente. Porém, isto não está ainda bem elucidado. Após uma primeira infecção por um grupo do VSR, aumenta a chance de que uma nova infecção venha a ocorrer por vírus de outro grupo<sup>19,36</sup>. A re-infecção por cepas de grupo homólogo pode também ocorrer<sup>36</sup>. A elevada proporção de alterações de nucleotídeos, levando a modificações na codificação de aminoácidos na proteína G de ambos os grupos, tem sido apontada como um possível mecanismo de escape do VSR frente à resposta imune do hospedeiro, promovendo repetidas infecções<sup>30</sup>. Em recente estudo sobre diversidade genética do VSR em repetidas infecções, os autores analisaram amostras de sete crianças, e em cinco delas, a re-infecção foi por um grupo heterólogo ou por genótipo diferente, pertencente ao mesmo grupo. Mas, nas duas outras crianças, a re-infecção ocorreu com o mesmo genótipo, com pequenas diferenças na proteína G do vírus. Os autores discutem se pequenas variações genômicas poderiam explicar as repetidas infecções do VSR, ponderando que, até o momento, existem poucos estudos desta natureza, o que dificulta conclusões definitivas sobre este assunto<sup>37</sup>.

O VSR é o principal agente etiológico de bronquiolites e pneumonias na criança nos primeiros anos de vida (lactentes e pré-escolares), com percentuais que variam de 5 a 40%, nas pneumonias, e de 40% a 90%, nas bronquiolites<sup>18</sup>. Em importante estudo realizado em

Washington (EUA), ao longo de 13 anos, em crianças de até seis anos de idade, hospitalizadas com infecção respiratória aguda, o VSR foi identificado em 43% das bronquiolites e em 25% das pneumonias <sup>38</sup>. Em recente estudo sobre hospitalizações associadas a infecções virais pelo VSR, Influenza e Parainfluenza, os autores identificaram que dentre as internações hospitalares causadas pelo VSR, em 79% o diagnóstico era de bronquiolite e em 27% era de pneumonia <sup>39</sup>. Anticorpos contra o VSR são encontrados em praticamente todos os adultos e crianças a partir dos três anos de idade. Com um ano de vida, 25 a 50% das crianças apresentam anticorpos contra o VSR, demonstrando a alta frequência desta infecção nesta idade <sup>40</sup>. A média de idade de crianças hospitalizadas com infecção pelo VSR é de três meses, segundo revisão publicada em 1999 <sup>18</sup>.

A prevalência elevada do VSR em infecções respiratórias agudas também foi evidenciada em estudos realizados em países em desenvolvimento, com taxas que variaram de 11 a 37% <sup>3</sup>.

No Brasil, estudos epidemiológicos sobre o VSR têm evidenciado uma elevada prevalência deste vírus em crianças com infecções respiratórias agudas (IRA). Um estudo longitudinal na cidade do Rio de Janeiro (RJ), durante quatro anos, avaliou a etiologia viral das infecções respiratórias agudas em crianças menores de cinco anos de idade. Dentre 656 amostras o VSR foi identificado em 67,8% delas <sup>22</sup>. Ainda no Rio de Janeiro, em outro estudo também sobre IRA, em 827 crianças hospitalizadas ou atendidas em ambulatórios, o VSR foi identificado em 38% dos casos <sup>41</sup>. Resultados semelhantes foram descritos em outras cidades do Brasil. Em Porto Alegre (Rio Grande do Sul), de 2337 amostras de crianças menores de cinco anos de idade com infecções respiratórias agudas, em 492 (21%) houve identificação do VSR <sup>42</sup>. Em Ribeirão Preto (São Paulo), um estudo avaliou a etiologia de IRA em crianças menores de dois anos de idade, atendidas em setor de emergência e mostrou que de 829 amostras analisadas, 188 (21,6%) foram positivas para VSR <sup>43</sup>. Em Vitória (Espírito Santo), o VSR foi identificado em 28% das amostras provenientes de crianças menores de cinco anos de idade atendidas com infecção respiratória aguda <sup>24</sup>.

Dados da OMS apontam para números globais anuais da ordem de 64 milhões de pessoas infectadas pelo VSR, com 160.000 mortes. Nos EUA, estima-se que o VSR seja responsável por 18000 a 75000 hospitalizações por ano, e por 90 a 1900 mortes anuais. A

taxa de incidência de infecção do trato respiratório inferior pelo VSR, em crianças saudáveis, foi calculada em 37 por 1000 crianças-ano, nos dois primeiros anos de vida, com um risco de hospitalização de 6 por 1000 crianças-ano<sup>10</sup>. Estudo recente com crianças menores de cinco anos de idade mostrou que mais da metade das hospitalizações por VSR ocorreram com lactentes menores de seis meses<sup>39</sup>. Além de uma elevada morbidade aguda, a bronquiolite viral aguda pelo VSR também determina altos custos para a saúde pública. Stang et al.<sup>44</sup> estimaram um custo médio de 7140 dólares por lactente até um ano de idade e de 6910 dólares por criança menor de cinco anos de idade numa internação hospitalar por bronquiolite pelo VSR – *estimativas obtidas a partir de dados de cerca de 900 hospitais*, em 17 estados americanos.

A apresentação clínica da doença causada pelo VSR é ampla e heterogênea, e varia desde uma infecção de vias aéreas superiores até bronquiolite ou pneumonia, dependendo principalmente da exposição prévia ao vírus e da idade da criança. A principal destas apresentações clínicas é a bronquiolite viral aguda (BVA). A associação entre VSR e BVA é tão relevante que o aumento do número de atendimentos por esta doença em uma determinada comunidade é suficiente para se afirmar que este vírus está circulando naquela localidade, mesmo antes do diagnóstico virológico. Durante o pico de ocorrência de VSR, 80% ou mais das bronquiolites são causadas por este vírus, segundo revisão sobre o assunto<sup>18</sup>.

## **1.2 A Bronquiolite Viral Aguda**

Como conceito geral, a BVA é uma infecção respiratória de etiologia viral, caracterizada por inflamação aguda, edema e necrose de células epiteliais das pequenas vias aéreas, aumento da produção de muco e broncoespasmo<sup>45</sup>.

Geralmente, o diagnóstico de BVA se baseia na apresentação clínica e os autores buscam uma definição que leve em consideração este fato, embora não exista ainda um consenso em torno disto. Nos EUA, considera-se como diagnóstico de BVA um primeiro evento de sibilância, em lactente previamente saudável, associado a sinais e sintomas de infecção respiratória aguda. Na Europa, maior peso é dado à presença de taquipnéia, hiperinsuflação pulmonar e creptações pulmonares difusas, ao longo da evolução clínica da doença<sup>46</sup>. A maioria dos clínicos baseia seu diagnóstico de BVA a partir de uma história de

infecção de vias aéreas superiores, seguida de esforço respiratório e sibilância, em criança menor de 12 meses de idade <sup>45</sup>.

A BVA é a principal doença do trato respiratório inferior do lactente, com pico de ocorrência aos dois meses de idade <sup>6</sup>. O curso clínico da BVA inicia com sinais e sintomas de um resfriado comum, com tosse, febre baixa e profusa rinorréia, que duram de dois a quatro dias. A seguir, surgem dispnéia e sibilos. A maioria das crianças apresenta um quadro de bronquiolite leve, não necessitando de hospitalização, e que dura em torno de uma semana. Em situações de maior gravidade, ocorre taquidispnéia, sibilos audíveis, irritabilidade, esforço respiratório com batimentos de aletas nasais e retrações torácicas. A cianose pode também estar presente, mas não é freqüente. A ausculta do tórax, além dos sibilos, mostra um tempo expiratório prolongado, roncos e crepitações. Geralmente, o pico do esforço respiratório ocorre de um a dois dias, com melhora clínica importante após este período. Durante a convalescença, sibilos e tempo expiratório prolongado podem persistir por sete a dez dias <sup>47</sup>.

Estudos têm mostrado que 15 a 30% das crianças hospitalizadas devido a bronquiolite evoluem com complicações agudas e requerem admissão em Unidades de Terapia Intensiva, com suporte ventilatório e uso prolongado de oxigênio <sup>18</sup>.

As taxas de mortalidade são baixas em crianças saudáveis, inferiores a 1%, considerando o acesso a cuidados intensivos. Porém, alguns fatores de risco como prematuridade, cardiopatias congênitas, imunodeficiências e doenças pulmonares crônicas (principalmente fibrose cística e displasia broncopulmonar) estão associados a apresentações mais graves da BVA, e podem levar a taxas de mortalidade mais elevadas. Por exemplo, pacientes em quimioterapia podem apresentar taxas de mortalidade de 15%. Em pacientes imunodeprimidos estes números chegam a 40% e em pacientes com cardiopatias congênitas a 37% <sup>46</sup>.

A BVA pode ocorrer a partir de uma infecção respiratória do trato superior por diversos vírus, como os vírus Influenza, Parainfluenza, Adenovírus, Metapneumovírus, Picornavírus, porém tem o VSR como o principal agente etiológico <sup>39</sup>.

A infecção pelo VSR inicia em células das vias aéreas superiores, e se propaga até o trato respiratório inferior, principalmente, bronquíolos. Neste local ocorre necrose epitelial

e destruição dos cílios. A seguir, observa-se uma seqüência de reações inflamatórias levando a edema da parede do bronquíolo, produção de muco, acúmulo de fibrina e de restos celulares. Esta cadeia de eventos leva a uma obstrução das pequenas vias aéreas, que pode ser parcial ou total, e vai determinar os achados radiológicos de hiperinsuflação ou atelectasias, respectivamente. Estes fenômenos obstrutivos induzem alterações na relação entre perfusão e ventilação que culmina com hipoxemia. Quadros mais graves podem apresentar insuficiência ventilatória, com importante hipoxemia, retenção de CO<sub>2</sub> e acidose respiratória<sup>48</sup>. Em casos não complicados, o epitélio bronquiolar regenera em três a quatro dias, porém, este tempo pode se prolongar, por duas ou mais semanas<sup>46</sup>.

Um dado que merece atenção com relação à infecção pelo VSR é a possibilidade de infecção nosocomial, principalmente, em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal. O vírus permanece viável por longos períodos no ambiente, dependendo do tipo de superfície, temperatura e condições de umidade<sup>49</sup>. A transmissão do VSR ocorre principalmente por contato direto (com as mãos) com secreções contaminadas em superfícies, mas também pode ocorrer por meio de partículas grandes infectadas e inoculadas em olhos e narinas – contato próximo – à distância de 1 metro<sup>50</sup>.

No recém-nascido, a BVA pode se apresentar de forma clássica, como ocorre no lactente, ou de forma atípica, com apnéia e cianose, exclusivamente. Outras vezes, o recém-nascido apresenta somente sintomas inespecíficos, como letargia, irritabilidade e dificuldade para mamar. O modo de transmissão do VSR e sua viabilidade no meio-ambiente, a dificuldade de reconhecimento da doença em neonatos, a capacidade de re-infecções em todas as faixas etárias fazem do VSR um importante agente de infecção hospitalar em pediatria<sup>49</sup>.

### 1.3 Sibilância Recorrente

Além de causar uma alta morbidade respiratória aguda, a BVA pelo VSR tem sido associada a problemas respiratórios em longo prazo, principalmente, a **sibilância recorrente (SR)**. Vários autores têm relatado um aumento do número de episódios de sibilância, hiperreatividade brônquica e asma em indivíduos após um quadro de BVA<sup>51</sup>. A literatura aborda este assunto com freqüência, mas é controversa em muitos aspectos. Os estudos utilizam metodologias distintas e, por isso, são dificilmente comparáveis.

Desde 1959, a associação entre bronquiolite e SR é relatada na literatura médica. Wittig et al.<sup>52</sup> encontraram 49% de doenças alérgicas respiratórias, incluindo asma brônquica, oito anos após um evento agudo de bronquiolite. Outros trabalhos, nos anos seguintes também evidenciaram esta associação, mas não havia a especificação do agente etiológico da bronquiolite<sup>53-55</sup>. Em 1971, é publicado o primeiro trabalho relatando uma associação entre BVA pelo VSR e desenvolvimento de SR<sup>56</sup>. Os autores evidenciaram uma incidência de 56% de SR nos anos seguintes a BVA e uma associação desta com história familiar de asma.

Na única metanálise existente sobre SR após BVA pelo VSR, publicada em 2000, os autores encontraram 30 artigos publicados entre janeiro de 1978 e dezembro de 1998. Deste total, 10 artigos preencheram os seguintes critérios para a análise, definidos *a priori*, no protocolo do estudo: a) todos os pacientes deveriam ter menos de um ano de idade no início da doença, b) os pacientes deveriam ter sido hospitalizados por bronquiolite, c) o diagnóstico de bronquiolite pelo VSR deveria ter sido confirmado laboratorialmente e d) ter sido utilizado um grupo-controle. Os resultados confirmaram a existência de SR após o evento agudo de bronquiolite e estes episódios de sibilância persistiram por 5 a 10 anos de seguimento. A SR foi definida como “três ou mais episódios de sibilância confirmada por um médico ou o uso de broncodilatador no ano anterior”. Esta metanálise mostrou também que a frequência de pacientes com SR após um episódio de bronquiolite por VSR decresceu com o aumento do tempo de seguimento<sup>57</sup>.

Elevadas taxas de prevalência ou incidência de SR após BVA pelo VSR foram relatadas por diversos autores. Sims et al.<sup>58</sup> avaliaram crianças oito anos após o evento agudo de bronquiolite por VSR e encontraram uma taxa de 51% de SR, sendo esta taxa significativamente mais elevada do que aquela observada no grupo-controle. Porém, estes episódios de sibilância não foram graves a ponto de resultar em internações hospitalares e a metade destes pacientes relatava não ter apresentado sibilância nos dois anos anteriores à pesquisa. Pullan & Hey<sup>59</sup>, em estudo de seguimento de 10 anos, encontraram 42% de incidência de SR após BVA por VSR. Um estudo prospectivo que avaliou crianças que tiveram BVA por VSR nos primeiros dois anos de vida encontrou uma taxa de 21% de recorrência de doença do trato respiratório inferior, com alterações da função pulmonar, que persistiram, em alguns casos, até os oito anos de idade<sup>60</sup>. Sly et al.<sup>61</sup> acompanharam 48 crianças após hospitalização por BVA pelo VSR e relataram que 92% destas crianças

tinham sintomas sugestivos de asma cinco anos após a BVA. Uma taxa de 44% de SR foi encontrada em Qatar (região do Golfo Árabe), em um estudo retrospectivo <sup>62</sup>. Um estudo prospectivo, realizado na Holanda, com duração de um ano, encontrou uma taxa de 47% de incidência de SR após o evento agudo de bronquiolite por VSR. Ao longo do período de acompanhamento, os pais anotaram diariamente a presença ou não de sintomas de doença respiratória (tosse, coriza e “chiado”) em seus filhos, o que facilitou a avaliação após um ano de seguimento <sup>63</sup>. Um estudo longitudinal realizado na Suécia avaliou 47 crianças após hospitalização devido a BVA pelo VSR, além de 93 controles, pareados por sexo, idade e local de residência, com resultados sistematizados após 1, 3, 7 e 13 anos de acompanhamento. A asma (definida como “três ou mais episódios de sibilância verificados por um médico”) foi mais freqüente no grupo VSR em todos os períodos de análise <sup>64-66</sup>.

Um importante aspecto na discussão acerca da SR após BVA por VSR se refere a quais fatores de risco poderiam estar envolvidos na sua gênese.

Bont et al. <sup>63</sup> avaliaram a possível associação entre obstrução do fluxo aéreo (sibilos expiratórios ou tempo expiratório prolongado) durante o episódio agudo de bronquiolite e SR, e evidenciaram uma forte associação. A incidência de SR foi de 61% no grupo com obstrução do fluxo aéreo *versus* 21% no grupo-controle.

A hospitalização da criança à época da BVA é apontada como fator de risco para SR após bronquiolite, indicando uma relação de gravidade da doença aguda com desenvolvimento de SR. Porém, existem poucos estudos abordando esta associação, já que a grande maioria destes é realizada em crianças internadas. Cifuentes et al. <sup>67</sup> evidenciaram maior risco relativo para SR após BVA pelo VSR em crianças internadas, se comparadas ao grupo-controle. Esta associação também foi evidenciada em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, porém, com crianças que tiveram bronquiolite não somente pelo VSR. Neste estudo longitudinal, foram comparados dois grupos de crianças que tiveram BVA no primeiro ano de vida. Os autores evidenciaram um percentual de 61,9% de SR entre as crianças que haviam sido hospitalizadas, ao passo que entre as crianças sem hospitalização prévia este percentual correspondia a 23,3% <sup>68</sup>. Porém, crianças não-hospitalizadas com quadros de BVA pelo VSR também podem apresentar SR, como foi demonstrado em um grande estudo longitudinal, realizado em Tucson, Arizona, EUA <sup>69</sup>.

O hábito de fumar no domicílio da criança constitui outro fator de risco explorado por estudos epidemiológicos sobre SR após BVA pelo VSR. Schauer et al.<sup>70</sup> avaliaram vários fatores de risco envolvidos no desenvolvimento de SR após BVA, dentre eles o hábito de fumar no domicílio por parte do pai, da mãe e o hábito de fumar da mãe durante a gravidez. Os autores apontaram como fatores de risco independentes para SR somente a BVA pelo VSR e o hábito de fumar da mãe durante a gravidez. O fumo passivo não se mostrou associado à SR após bronquiolite em outros estudos<sup>63,68</sup>.

O termo “sibilância recorrente após BVA” não tem uma definição consensual entre os autores e isto pode levar a diversas interpretações. Stein et al.<sup>69</sup> dividiram a SR em duas categorias: sibilos infreqüentes – até três episódios de sibilância no ano anterior, e sibilos freqüentes – mais de três episódios no ano anterior (ao da entrevista). Para quantificar os sintomas respiratórios ao longo de um ano, Bont et al.<sup>63</sup> contaram o número de episódios de tosse e/ou sibilância, considerando como um episódio a presença destes sintomas por dois ou mais dias consecutivos. Outra definição também encontrada na literatura, mencionada anteriormente, define SR como: “três ou mais episódios de sibilância confirmada por um médico ou o uso de broncodilatador no ano anterior”<sup>57</sup>.

Face à falta de consenso quanto à definição de SR após BVA e dada a semelhança desta com os sintomas de asma brônquica, persiste uma confusão em relação a estes dois termos. Além disto, o próprio termo “asma” vem sendo discutido pela literatura recente. Sendo uma doença bastante heterogênea na infância, admite-se a existência de vários tipos de asma. Stein & Martinez<sup>71</sup> propõem três diferentes fenótipos para a asma: sibilantes transitórios, asma mediada por IgE e asma não atópica.

Um dos fenótipos estaria associado a uma modalidade transitória de sibilância, com episódios que persistem até a idade pré-escolar, que não estão associados a uma história familiar de asma ou atopia e que poderiam ter como fator de risco primário uma redução da função pulmonar do lactente, antes deste apresentar uma doença respiratória do trato inferior<sup>72,73</sup>.

Um outro fenótipo de asma seria a, assim denominada, asma clássica ou asma atópica, com níveis elevados de IgE, eosinofilia e/ou testes intradérmicos positivos e uma predisposição genética (história familiar positiva para asma)<sup>71</sup>.

O terceiro fenótipo (asma não atópica) seria representado por aquelas crianças que iniciaram os episódios de sibilância após uma doença respiratória aguda do trato inferior, ocorrida antes dos três anos de idade. Estas crianças apresentavam um aumento significativo de SR até a idade dos 10 anos, e esta sibilância decrescia a níveis pouco relevantes aos 13 anos de idade. Não foi observada associação com atopia ou história familiar de asma <sup>69</sup>. A partir destes achados, os autores sugerem que a infecção do trato respiratório inferior pelo VSR não constitui, isoladamente, um fator de risco para a asma atópica, condição mórbida mais prevalente em crianças na idade escolar e na adolescência. Este fenótipo corresponderia ao que aqui estamos denominando SR após BVA pelo VSR.

A não relação entre SR após BVA pelo VSR e doença atópica também foi relatada por Sims et al. <sup>58</sup> que não encontraram diferença entre os grupos quanto a diagnósticos clínicos de eczema, rinite alérgica e urticária. Pullan & Hey <sup>59</sup> pesquisaram sensibilização alérgica dez anos após BVA pelo VSR por meio de testes cutâneos e não evidenciaram associação entre estas duas condições clínicas. Mas, não há acordo sobre este fato na literatura. Schauer et al. <sup>70</sup> evidenciaram que ocorreu sensibilização alérgica em crianças um ano após a ocorrência de BVA pelo VSR. Esta sensibilização foi principalmente devida a antígenos alimentares. Sigurs et al. <sup>66</sup> e Sigurs <sup>74</sup> também relataram ser uma BVA pelo VSR no primeiro ano de vida um fator de risco independente para a sensibilização alérgica.

Outro dado importante nesta discussão é a história familiar de asma. Sigurs <sup>74</sup> relata, em uma revisão de seus artigos anteriores, que a combinação de história familiar de asma e BVA pelo VSR aumentou o risco para asma (definida como três ou mais episódios de sibilância verificados por um médico), aos três anos de idade. Porém, esta associação não permaneceu significativa quando as crianças completaram sete anos e meio de idade. Aos treze anos, foram evidenciados dois fatores de risco independentes para asma: uma história de BVA pelo VSR na infância e história familiar de asma <sup>66</sup>. Uma história familiar de asma também foi relatada como fator de risco para SR após BVA pelo VSR por Welliver & Duffy <sup>75</sup>. Porém, estudos de outros autores não evidenciaram tal associação <sup>60,61,68</sup>.

Ainda pairam muitas dúvidas acerca da patogênese da SR após BVA pelo VSR. Seria o VSR o causador do desenvolvimento da sibilância recorrente nos anos seguintes a um evento agudo de bronquiolite ou seria este vírus, de fato, um marcador de uma suscetibilidade pré-existente? Como a maioria das crianças tem infecção pelo VSR até três

anos de idade, parece pouco provável que somente a infecção esteja relacionada a problemas respiratórios em longo prazo <sup>76</sup>.

Na primeira situação, ocorreria um dano tecidual causado pela infecção viral, o que tem sido estudado em modelos animais. Algumas evidências sugerem que uma infecção pelo VSR levaria a uma exposição e ativação de *irritant receptors*, ativação neural colinérgica e aumento da expressão de receptores celulares de neuropeptídeos (substância P), todos envolvidos com o efeito broncoconstrictor observado nesta infecção <sup>77</sup> e possivelmente associados aos efeitos em longo prazo <sup>78</sup>.

Porém, a maioria dos estudos sugere a segunda hipótese. Existiriam condições anteriores à infecção pelo VSR, que, na presença do vírus, determinariam os sintomas respiratórios em longo prazo.

Alterações anatômicas ou funcionais das vias aéreas, geneticamente determinadas, poderiam levar a uma diminuição da função pulmonar e predispor a criança a sibilância durante uma infecção viral. Esta hipótese foi evidenciada por Martinez et al. <sup>72</sup> que conduziram estudo no qual avaliaram a função pulmonar de 124 crianças antes da ocorrência de qualquer infecção do trato respiratório inferior, e acompanharam estas crianças ao longo do seu primeiro ano de vida. As crianças com diminuição da função pulmonar antes de qualquer infecção respiratória apresentaram um risco maior de infecção do trato respiratório inferior, acompanhada de sibilância, ao longo do primeiro ano de vida. Posteriormente, esta condição foi avaliada como fator de risco para a SR. Este estudo integra uma série de análises de uma coorte que acompanhou crianças até a adolescência. Os autores identificaram que estas crianças seriam os sibilantes transitórios, ou seja, aqueles que apresentam sintomas recorrentes até cerca de três a cinco anos de idade, geralmente não associados a atopia <sup>71</sup>.

Outra hipótese bastante estudada é a interação ente o vírus e a resposta imunológica do hospedeiro. Algumas possibilidades são aventadas: doença grave pelo VSR ocorrendo em uma criança com pré-disposição a atopia, em uma idade vulnerável, doença grave pelo VSR levando à inflamação e remodelamento das vias aéreas inferiores, e, por último, que crianças com doença grave pelo VSR teriam um defeito do sistema imunológico, facilitando a sensibilização alérgica e o desenvolvimento de SR <sup>76</sup>.

Não está bem definida ainda a natureza da resposta imunológica desencadeada pelo VSR, mas dados sugerem que exista um predomínio de resposta celular *T-helper* tipo 2 .

Habitualmente, uma infecção viral induz uma resposta celular citotóxica, com linfócitos *T-helper* tipo 1, caracterizada por elevada produção de *gamma interferon* (IFN- $\gamma$ ). Porém, na BVA pelo VSR observa-se um desequilíbrio na relação entre estas duas respostas, com aumento da resposta Th2 e/ou resposta Th1 deficiente, com produção de citocinas IL-4 e IL-5, típicas de doenças alérgicas, como asma brônquica <sup>79</sup>.

Ainda existem muitas questões não respondidas sobre o VSR, a bronquiolite e o desenvolvimento de SR. Resultados controversos vêm sendo publicados, principalmente, em relação a aspectos epidemiológicos. Provavelmente isto se deve a diferenças metodológicas e à falta de padronização dos termos utilizados e critérios de inclusão nos estudos. Além disto, a maioria dos estudos é realizado com crianças hospitalizadas, o que indica uma maior gravidade da doença, não devendo tais achados ser comparados com estudos em pacientes ambulatoriais.

Existe a necessidade de estudos adicionais sobre SR após BVA pelo VSR, para que seja possível ampliar o conhecimento sobre esta condição clínica, principalmente em países em desenvolvimento. A grande maioria dos estudos é realizada em países desenvolvidos e ainda pouco se conhece sobre esta condição clínica em países em desenvolvimento, principalmente em locais de clima tropical <sup>80</sup>. Dada a sua relevância em saúde pública, além das inegáveis especificidades dessas populações e contextos, em termos da composição étnica e perfil imunogenético, das cepas virais circulantes em cada contexto e comunidade, das condições ecológicas *sensu lato* em que têm lugar os quadros mórbidos, além das diferenças relativas ao acesso aos serviços de saúde, e sua respectiva qualidade e resolutividade, não resta dúvida de que se trata de uma lacuna a ser urgente e necessariamente preenchida.

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Determinar a taxa de incidência de sibilância recorrente após um evento de bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, em uma amostra de crianças menores de um ano de idade, atendidas em um setor de Pronto-Socorro.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar os principais vírus respiratórios descritos como agentes etiológicos da bronquiolite viral aguda: Vírus Sincicial Respiratório, Metapneumovírus Humano, Influenza A e B, Parainfluenza tipos 1, 2 e 3 e Adenovírus;
- Descrever uma amostra de crianças menores de um ano de idade atendidas em Pronto-Socorro com um quadro de bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, em relação a variáveis sócio-demográficas e hábitos comportamentais dos pais;
- Determinar a frequência de internação hospitalar deste grupo de crianças por doença respiratória aguda ao longo do período de acompanhamento;
- Investigar possíveis fatores de risco associados à sibilância recorrente pós-bronquiolite, como idade da criança e necessidade de hospitalização no momento da doença aguda, sexo do paciente, hábito materno de fumar durante a gravidez, presença de fumantes no domicílio da criança e história familiar de asma e atopia.

### **3. METODOLOGIA**

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Descrição do estudo

Este estudo foi realizado no setor de Pronto-Socorro do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG), situado na cidade de Vitória - Espírito Santo (ES). Há 70 anos o HINSG é o hospital de referência da rede estadual do Serviço Único de Saúde no atendimento de urgência e emergência em pediatria no ES, atendendo principalmente aos municípios da Região Metropolitana de Vitória, bem como do interior do estado e de regiões limítrofes com os estados de Minas Gerais e Bahia.

Trata-se de um estudo observacional, longitudinal, prospectivo, conduzido no período de março de 2004 a outubro de 2006, acompanhando crianças após um evento de BVA pelo VSR, de modo a observar a sua possível associação com SR.

Os pacientes foram arrolados em dois períodos: março a setembro de 2004 e março a setembro de 2005. Estes meses correspondem à época de maior circulação de vírus respiratórios na região do estudo <sup>24</sup>. A seleção dos pacientes ocorreu de segunda a sexta-feira, somente no período matutino, com coleta de secreção de nasofaringe (SNF) – espécime clínico eleito para o estudo – de crianças que preencheram os seguintes **critérios de inclusão**:

- Faixa etária: menores de um ano de idade.
- Primeiro episódio de sibilância.
- Quadro clínico compatível com bronquiolite viral aguda, definida pela presença de sibilos e hiperinsuflação pulmonar, com curso clínico iniciando com sinais e sintomas de uma infecção do trato respiratório superior por um período de dois a quatro dias, seguido por dispnéia e sibilos <sup>47</sup>.
- Tempo de doença inferior a oito dias.
- Consentimento, por escrito, do responsável pela criança, após explanação sobre os propósitos do estudo e leitura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Critérios de exclusão:** foram excluídas as crianças submetidas à ventilação mecânica durante o evento agudo de bronquiolite ou no período neonatal, bem como aquelas que apresentavam doenças associadas a um maior risco de uma bronquiolite grave: prematuridade, cardiopatia congênita e doenças pulmonares crônicas como fibrose cística e displasia broncopulmonar.

O tamanho da amostra foi inicialmente calculado com o objetivo de comparar dois grupos de crianças: um grupo de crianças com BVA, com resultado laboratorial positivo para VSR e outro grupo de crianças com BVA, com resultado laboratorial negativo para VSR, o que significaria ser positivo para outros vírus ou ter amostra clínica totalmente negativa. Neste contexto, cada grupo deveria contar com 60 participantes. Dada a alta prevalência do VSR, não foi possível, ao longo do período de recrutamento, em duas epidemias, compor o grupo de crianças negativas para o VSR. A amostra acompanhada foi, portanto, o universo de pacientes que preencheram os critérios de inclusão, no serviço de emergência de referência de Vitória, ao longo de duas epidemias de VSR, em 2004 e 2005.

## **3.2 Coleta de dados**

### **3.2.1 Coleta de amostras biológicas**

A coleta de SNF foi realizada mediante aspiração, sendo utilizado um sistema coletor constituído de uma sonda de aspiração número 6, acoplada a um equipo de infusão de soro, conectado a um aspirador manual ou de parede. O material coletado era enviado, dentro de uma caixa térmica com gelo, ao Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), para realização do exame laboratorial. A descrição deste procedimento encontra-se no ANEXO 1.

### **3.2.2 Entrevista com o responsável pela criança**

O responsável pela criança era entrevistado, seguindo o roteiro de um questionário estruturado, para a obtenção de informações referentes a variáveis sócio-demográficas ou que caracterizassem uma eventual associação com a BVA ou com a SR, como descrito a seguir:

- Dados do período neonatal e doenças associadas
- Aleitamento materno exclusivo
- Dados relacionados à transmissão domiciliar de infecção respiratória
- Escolaridade materna e paterna
- Hábitos comportamentais durante a gravidez (ingestão de álcool e hábito de fumar) e presença de fumantes no domicílio
- História familiar (pais) de atopia, investigada em relação a sinais e sintomas de rinite alérgica
- História familiar (pais) de asma brônquica
- Dados clínicos e radiológicos da BVA

O questionário utilizado está no ANEXO 2.

### 3.2.3 Seguimento das crianças

Após a entrevista, o responsável pela criança recebia um cartão com as informações necessárias ao acompanhamento do paciente, listadas a seguir:

- A informação de que o paciente era participante de um projeto de pesquisa
- Os telefones de contato com a pediatra responsável pelo seu acompanhamento
- O dia de retorno à primeira consulta de seguimento
- Local para anotação, caso fosse necessário procurar um outro serviço de saúde, quanto à presença de sinais de broncoespasmo durante alguma consulta. Isto era feito de forma simples, com apenas um **X**, assinalando “sim ou não”

O seguimento dos pacientes ficou sob a responsabilidade da pediatra responsável pelo estudo e ocorreu sempre no ambulatório anexo ao NDI – UFES, no período de abril de 2004 a outubro de 2006. As crianças acompanhadas foram as que preencheram os critérios de inclusão no estudo e que apresentaram resultado laboratorial positivo para o VSR.

A primeira consulta de retorno era marcada com um intervalo de um mês após o dia do atendimento no Pronto-Socorro e inclusão da criança no estudo. Nesta consulta, o responsável pela criança era interrogado quanto à evolução do paciente durante e após a BVA, como descrito a seguir:

- Sobre a ocorrência de hospitalização durante a BVA ou no intervalo até a primeira consulta de retorno
- Tempo de hospitalização
- Duração dos sintomas
- Medicação utilizada
- Se houve recorrência de sibilância no intervalo até a primeira consulta de retorno, após a cessação dos sintomas da bronquiolite.

As crianças eram submetidas a exame clínico geral e a família orientada novamente sobre o estudo e sobre a necessidade de manter o acompanhamento ambulatorial.

As consultas de retorno eram agendadas em intervalos de três meses. Em cada consulta o responsável pela criança era entrevistado quanto a sinais e sintomas de doença respiratória aguda, principalmente sibilância, durante o tempo transcorrido desde a última consulta, necessidade de hospitalização ou de atendimento em setor de Pronto-Socorro e medicação utilizada. As anotações do cartão eram conferidas, sendo então marcada a consulta subsequente. Se necessário, eram solicitados exames complementares. O responsável pela criança era autorizado a fazer contato por telefone ou comparecer ao ambulatório em caso de doença respiratória aguda.

Em caso de falta à consulta, a família era contatada por telefone para remarcação da mesma. Se não fosse possível o contato por telefone ou em caso de uma nova falta, o prontuário do paciente era separado para posterior visita domiciliar. Estas visitas eram realizadas pela pediatra responsável pelo estudo e organizadas por município de procedência do paciente.

### **3.3 Métodos laboratoriais**

O diagnóstico laboratorial, virológico, foi realizado por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) no NDI - UFES e de técnica de biologia molecular, no NDI - UFES e Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.

O processamento do espécime clínico (ANEXO 3) era realizado no mesmo dia da coleta, no período vespertino. As lâminas eram guardadas em *freezer* a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior realização da RIFI, utilizando um *kit* comercial contendo anticorpos monoclonais

específicos para sete diferentes vírus respiratórios: Adenovírus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza Tipo 1, Parainfluenza Tipo 2, Parainfluenza tipo 3 e VSR (Chemicon International, Inc. Temecula, CA “Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification Kit”). A descrição da RIFI encontra-se no ANEXO 4.

O diagnóstico molecular foi realizado, visando a detecção do genoma do VSR e também do Metapneumovírus humano (hMPV) por meio da técnica de Transcrição Reversa-Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR), seguida por semi-nested PCR (RT-snPCR).

A técnica de RT-snPCR utilizada para o diagnóstico do VSR foi realizada conforme descrição de Galiano et al.<sup>81</sup> com modificações estabelecidas no NDI-UFES (ANEXO 5). Na primeira PCR foram utilizados o iniciador reverso LG3 e o iniciador direto LG5 que amplificam o gene completo da proteína G, tanto do grupo A quanto do B. Na snPCR foram utilizados os iniciadores diretos GA480 e GB496, junto com o iniciador reverso LG3, em reações separadas, para amplificação de regiões específicas do gene G do VSR dos grupos A e B, respectivamente.

Para o diagnóstico do hMPV foi seguido o protocolo gentilmente cedido pelo Dr. Juan Arbiza (*Sección Virologia Facultad de Ciências Universidad de la República - Uruguay*) e modificado no NDI-UFES (ANEXO 5). Foram utilizados iniciadores descritos por Côté et al.<sup>82</sup> para gene N: N1 e N3, utilizados na primeira PCR e N2 e N3, na snPCR.

### **3.4 Mensuração da variável-desfecho**

O desfecho do estudo foi a taxa de incidência anual de SR após BVA pelo VSR. Não foi definido *a priori* um número mínimo de episódios de sibilância para a caracterização do desfecho. A cada consulta ou visita domiciliar era contado o número de episódios de sibilância ocorridos no intervalo desde a última avaliação do paciente. Foram considerados episódios de sibilância quando obedecida alguma destas condições:

- Anotação, no cartão de acompanhamento da criança, feita por um médico, sobre a ocorrência de sinais de broncoespasmo em alguma consulta.
- Prescrição médica de broncodilatadores.

- Descrição por parte da mãe ou do responsável pela criança de tosse, acompanhada de chiado no peito ou dificuldade para respirar, que tenha exigido o uso de broncodilatador para seu alívio. Neste caso, somente foi considerada sibilância caso a informação estivesse correta quanto ao nome do medicamento, dose e intervalo e se tivesse ocorrido alívio dos sintomas imediatamente após o uso. Geralmente, o broncodilatador utilizado nestas situações era um beta 2 agonista, em nebulizações.

### **3.5 Mensuração das co-variáveis: história familiar de asma ou atopia**

A história de atopia familiar foi avaliada a partir de informações sobre sinais e sintomas atuais de rinite alérgica no pai e/ou na mãe. Definiu-se rinite alérgica a partir da combinação de dois ou mais dos seguintes sinais ou sintomas:

- Espirros freqüentes (em salva)
- Coriza freqüente
- Prurido nasal freqüente
- Obstrução nasal freqüente

A história familiar de asma foi avaliada de acordo com perguntas sugeridas pelo III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma <sup>83</sup>, descritas no Anexo 2. Foi avaliada a presença de asma brônquica no pai e/ou na mãe. Foi considerada asma brônquica quando havia resposta positiva para diagnóstico médico de asma, presença de sibilância cuja melhora estava associada a uso de medicação broncodilatadora ou história patológica progressiva de asma brônquica na infância ou adolescência. Quando a história de asma era relatada somente em relação ao período da infância ou adolescência dos pais, era perguntado sobre a necessidade de atendimento em setor de pronto-atendimento, uso de medicação broncodilatadora para alívio dos sintomas e internações hospitalares. Em caso de dúvida, esta questão voltava a ser investigada ao longo do período de seguimento, contando com informações dos avós, sempre que possível.

Para a análise multivariada, estas variáveis (“história familiar de asma” e “história familiar de atopia”) foram definidas de duas formas distintas:

**Variável “atopia familiar 1”:**

- ao menos um familiar com atopia (pai e/ou mãe com rinite alérgica) *versus* ausência (nenhum familiar) de história familiar de atopia

**Variável “atopia familiar 2”:**

- história de atopia (rinite alérgica) no pai ou mãe (mutuamente exclusivos) *versus* em ambos os pais *versus* ausência de história familiar de atopia

**Variável “asma familiar 1”:**

- ao menos um familiar com asma (pai e ou mãe) *versus* ausência (nenhum familiar) de história familiar de asma.

**Variável “asma familiar 2”:**

- história de asma no pai ou mãe (mutuamente exclusivos) *versus* em ambos os pais *versus* ausência de história familiar de asma

**3.6 Análise estatística**

Para a criação do banco de dados e análises preliminares foi utilizado o programa SPSS versão 10.0. Para a elaboração dos modelos estatísticos foi utilizado o programa de domínio público R versão 2.4.1 (2006).

Inicialmente, foram desenvolvidas análises exploratórias, sendo os resultados representados em tabelas e gráficos. Os dados foram avaliados quanto à frequência e completude, sendo então calculadas as medidas de tendência central e dispersão.

A análise dos dados do estudo longitudinal foi feita por meio do modelo linear generalizado com distribuição de Poisson e função de ligação logarítmica. O critério estabelecido para a inclusão dos participantes na análise foi a disponibilidade de dados referentes à linha de base e dois ou mais pontos de observação ao longo do período de acompanhamento.

Foi calculada a taxa de incidência anual de sibilância recorrente após bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório no período de dois anos e meio de acompanhamento das crianças. O numerador desta taxa foi o número total de episódios de sibilância ocorridos no período. O denominador foi composto pelo total de crianças-ano observadas.

Foi verificada a associação entre sibilância recorrente e possíveis fatores de risco: a idade da criança no momento do diagnóstico de BVA, o sexo do paciente, o hábito de fumar por parte da mãe durante a gravidez, a presença (ou não) de familiar fumante no domicílio do paciente, a necessidade de internação hospitalar quando do episódio de BVA, a história familiar de atopia (rinite alérgica nos pais) e a história familiar de asma nos pais. A medida de associação foi a razão de taxas de incidência com intervalo de confiança de 95%. Os fatores, cuja associação com o desfecho foi significativa ao nível de  $p \leq 0,10$ , foram incluídos na análise multivariada.

### **3.7 Termo de consentimento livre e esclarecido**

O acompanhante era informado sobre o projeto de pesquisa, sendo a criança efetivamente incluída no estudo exclusivamente após o consentimento expresso do pai, mãe ou guardião legal, por escrito. O termo de consentimento encontra-se em anexo (ANEXO 6). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde – UFES e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ENSP – FIOCRUZ.

A identificação do paciente foi mantida em sigilo durante todo o procedimento de diagnóstico laboratorial. Cada amostra clínica recebia um código ao chegar ao laboratório que foi utilizado em todos os procedimentos de análise dos resultados. As fichas contendo os dados pessoais dos pacientes estão arquivadas em armário próprio, sob a guarda da pesquisadora responsável pelo projeto.

## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

Durante os períodos de março a setembro de 2004 e março a setembro de 2005 foram coletados espécimes clínicos (SNF) de 166 crianças menores de 12 meses de idade, com quadro clínico compatível com bronquiolite viral aguda, atendidas em Pronto-Socorro e que preencheram os critérios de inclusão do estudo.

### 4.1 Diagnóstico virológico

O VSR foi o vírus mais frequentemente identificado, seguido pelo hMPV. Não foram detectados os seguintes vírus: Adenovírus, Influenza A, Influenza B e Parainfluenza tipo 2.

Foi realizada RIFI em todas as 166 amostras. Em 41 destas (25%) o resultado foi inconclusivo. O VSR foi pesquisado por RIFI e RT-PCR, o hMPV por RT-PCR e os demais vírus somente por RIFI.

A reação de RT-PCR para o VSR foi realizada em 156 amostras e a reação de RT-PCR para o hMPV em 160 amostras. Estes resultados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1. Vírus respiratórios identificados em 166 crianças menores de 12 meses de idade com bronquiolite viral aguda, Vitória, Espírito Santo, 2004/5**

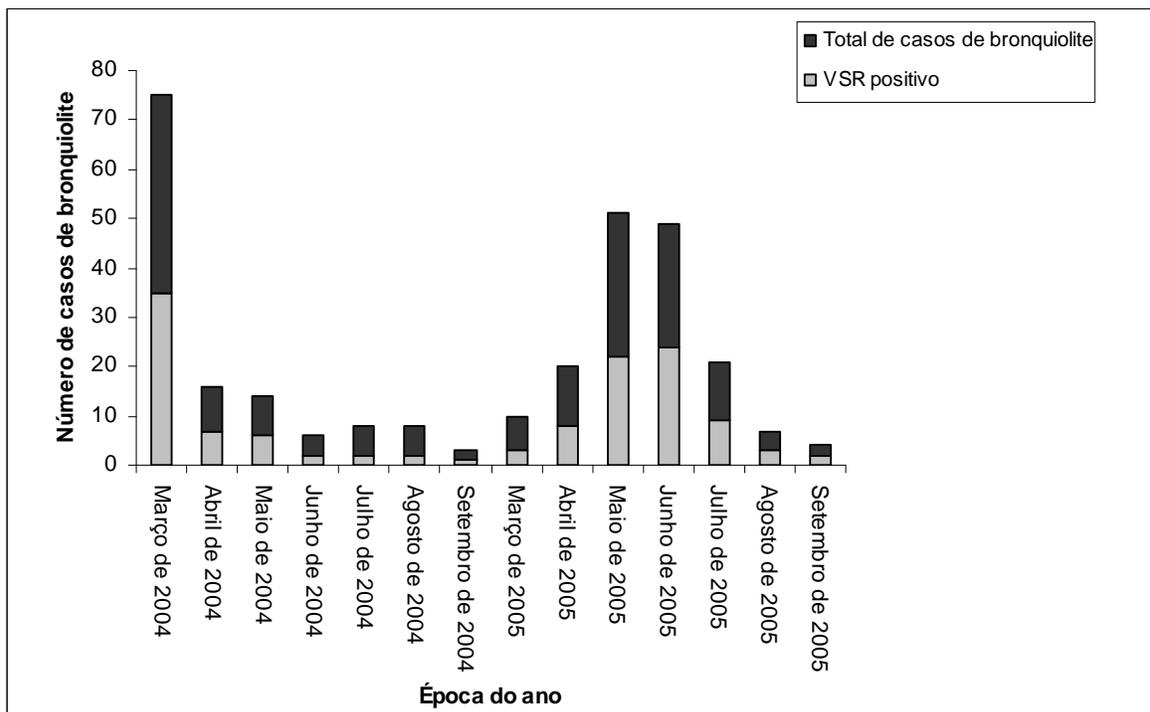
Vírus	Método			
	RIFI N (%)		RT-PCR N (%)	
	positivo	negativo	positivo	negativo
<b>Vírus Sincicial</b>	91 (55)	34 (20)	114 (69)	42 (25)
<b>Respiratório</b>				
<b>Metapneumovírus</b>	NR	NR	24 (14)	136 (82)
<b>Humano</b>				
<b>Parainfluenza tipo 1</b>	3 (2)	122 (73)	NR	NR
<b>Parainfluenza tipo 3</b>	2 (1)	123 (74)	NR	NR

RIFI – reação de imunofluorescência indireta; RT-PCR – transcrição reversa-reação em cadeia pela polimerase; NR – não realizado

A presença de co-infecção pelo VSR e hMPV foi avaliada em 155 amostras em que foi realizada a RT-PCR tanto para VSR quanto para hMPV. Observou-se a presença de co-infecção em 16 (10,3%) destas. Não foi observada co-infecção pelo VSR e os vírus Parainfluenza.

#### 4.2 Distribuição temporal do VSR

Em 126 (76%, de um total de 166 amostras), obteve-se resultado positivo para VSR por algum dos métodos utilizados (RIFI ou RT-PCR). A distribuição destas amostras por época do ano em que houve coleta de espécime clínico, está apresentada no Gráfico 1. No período de coleta do ano de 2004, a ocorrência de BVA, bem como a identificação do VSR, aconteceu principalmente no mês de março, enquanto no período de coleta do ano de 2005, tal fato foi verificado especialmente nos meses de maio e junho.



**Gráfico 1. Distribuição temporal dos casos de bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, Vitória, Espírito Santo, 2004/5**

### **4.3 Resultados do estudo longitudinal**

Das 126 crianças positivas para VSR por RIFI ou RT-PCR foi possível acompanhar, ao longo do período subsequente ao evento agudo de bronquiolite, 76 (60%) delas. A utilização conjunta dos dois métodos quanto ao diagnóstico de VSR, nestas amostras, ficou assim distribuída:

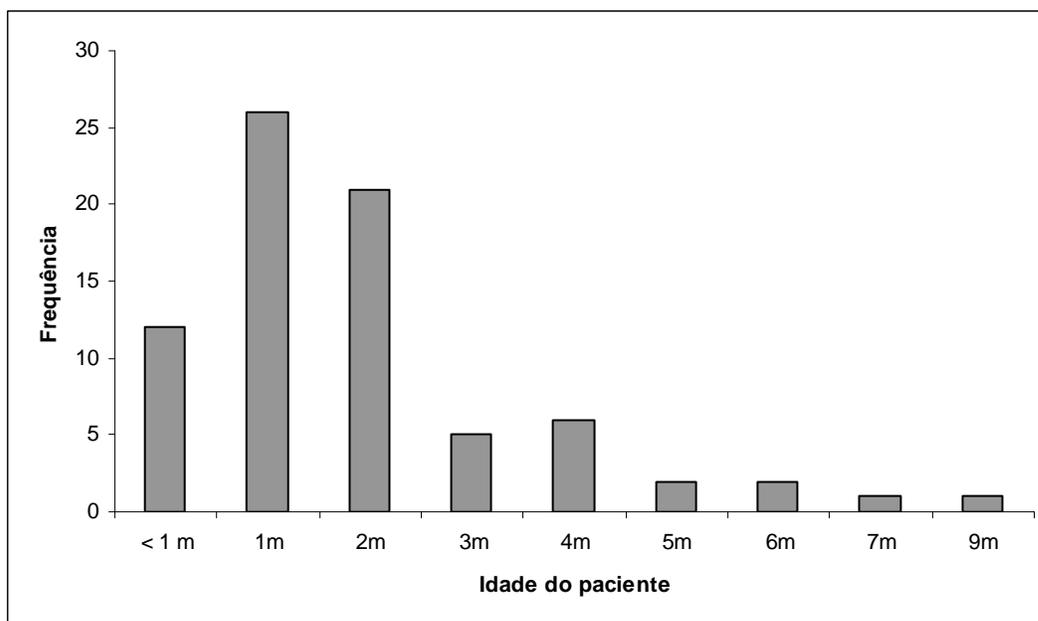
- 45 amostras positivas nos dois métodos
- 17 amostras inconclusivas na RIFI e positivas na RT-PCR
- 6 amostras negativas na RIFI e positivas na RT-PCR
- 8 amostras positivas na RIFI e negativas na RT-PCR

Todos os resultados apresentados a seguir referem-se a este grupo de 76 crianças.

#### **4.3.1 Caracterização da amostra**

Setenta e seis (76) crianças foram acompanhadas no período de abril de 2004 a outubro de 2006 com o objetivo de identificar SR após BVA pelo VSR.

A idade destas crianças, no momento do diagnóstico da BVA, variou de menos de um mês a nove meses, com mediana de um mês e meio de idade (Gráfico 2).



**Gráfico 2. Distribuição por idade, de 76 crianças menores de um ano, com diagnóstico de bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, Vitória, Espírito Santo, 2004/5**

A maioria (58%) dos pacientes era do sexo masculino.

A média e mediana de habitantes por domicílio foi de cinco pessoas, ao passo que a média e mediana do número de pessoas dividindo o mesmo quarto de dormir do paciente foi de três. Na maioria dos casos (68%) havia um familiar com infecção respiratória aguda no domicílio do paciente, no momento do diagnóstico da BVA.

A escolaridade dos pais foi avaliada quanto ao número de anos escolares concluídos com aprovação e teve uma média e mediana de oito anos, tanto para os pais quanto para as mães.

A maioria das mães (91%) relatou não ter fumado durante a gravidez. Em 35,5% dos casos havia um familiar fumante no domicílio do paciente.

Foi avaliada a necessidade de hospitalização do paciente durante a BVA como medida de gravidade da doença. Quarenta e sete (47) pacientes (62%) necessitaram de internação hospitalar. Estes resultados estão apresentados na Tabela 2.

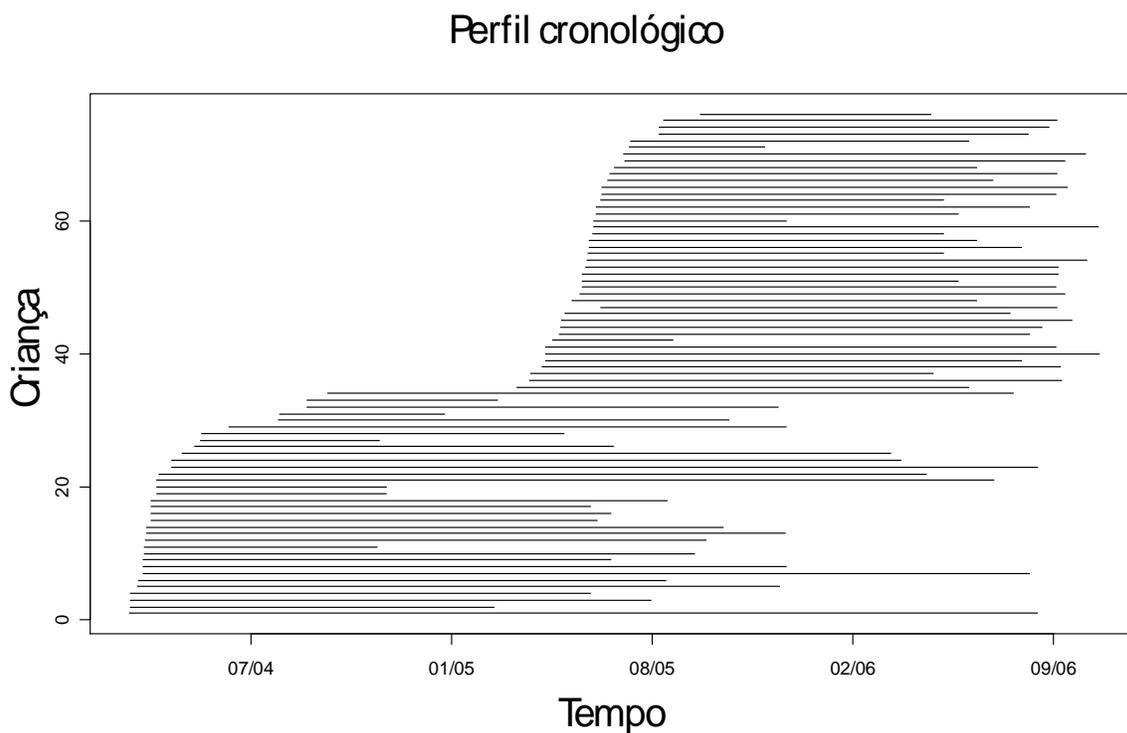
**Tabela 2. Características da amostra de 76 crianças com diagnóstico de bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, acompanhadas no estudo longitudinal, Vitória, Espírito Santo, 2004/5**

<b>Variáveis</b>	<b>Resultados</b>
<b>Variáveis categóricas</b>	<b>n (%)</b>
Sexo	
Masculino	44 (57,9)
Feminino	32 (42,1)
Familiar com infecção respiratória aguda	
Sim	52 (68,4)
Não	21 (27,6)
não informado	3 (3,9)
Hábito da mãe de fumar na gravidez	
Sim	7 (9,2)
Não	69 (90,8)
Familiar fumante no domicílio	
Sim	27 (35,5)
Não	49 (67,5)
Hospitalização do paciente à época da BVA	
Sim	47 (61,8)
Não	29 (38,2)
<b>Variáveis contínuas</b>	<b>Média (desvio padrão)</b>
Habitantes por domicílio	4,9 (1,74)
Número de pessoas no quarto do paciente	3,1 (0,78)
Escolaridade materna	8,0 (2,34)
Escolaridade paterna	7,9 (2,59)

BVA – bronquiolite viral aguda

### 4.3.2 Perfil cronológico do seguimento dos pacientes

O acompanhamento dos pacientes ocorreu ao longo de um período de dois anos e meio (abril de 2004 a outubro de 2006). Cada criança participou do estudo de forma diferente ao longo deste período de observação. Somente foram considerados para análise e constam dos resultados, os pacientes com três ou mais pontos de observação (linha de base mais duas visitas subsequentes), totalizando 76 crianças. O tempo com que cada uma destas crianças contribuiu com seus dados para a análise dos resultados está representado no Gráfico 3.



**Gráfico 3. Perfil cronológico do seguimento de cada criança no estudo, no período de abril de 2004 a outubro de 2006, Vitória, Espírito Santo**

### **4.3.3 Hospitalização do paciente durante o acompanhamento**

Durante o período de acompanhamento dos pacientes, seis crianças (8%) necessitaram de internação hospitalar devido a doença respiratória aguda acompanhada de sibilância.

### **4.3.4 Taxa de incidência de sibilância recorrente**

O desfecho deste estudo foi a taxa de incidência de SR após um evento de BVA pelo VSR. Mensurou-se esta taxa por ano de observação. A taxa bruta de SR após BVA pelo VSR foi de 3,7 episódios criança-ano (IC 95%, 3,3 – 4,1). Este valor corresponde à média das taxas individuais de cada criança, construídas da seguinte forma:

- numerador: número de episódios de sibilância apresentados pela criança
- denominador: tempo, em anos, em que cada criança participou do estudo

A descrição destes valores encontra-se no ANEXO 7.

### **4.3.5 Análise bivariada**

A taxa de incidência de SR após BVA pelo VSR mostrou-se discretamente decrescente à medida que era mais elevada a idade da criança no momento do diagnóstico de bronquiolite, mas esta aparente tendência não foi estatisticamente significativa ( $p=0,36$ ).

Observou-se associação entre o sexo do paciente e a presença de SR após BVA pelo VSR. As meninas apresentaram uma taxa de incidência anual de SR 20% maior do que os meninos.

Não foi observada associação entre o desfecho SR após BVA pelo VSR e o hábito de fumar por parte da mãe durante a gravidez ( $p=0,76$ ), assim como também não foi observada associação entre SR após BVA pelo VSR e a presença de fumante no domicílio do paciente ( $p=0,15$ ).

A necessidade de internação do paciente durante a BVA mostrou-se associada ao desfecho. Crianças que foram hospitalizadas quando do episódio agudo de bronquiolite apresentaram uma taxa de incidência anual de SR após BVA pelo VSR 39% maior que as crianças que não foram hospitalizadas.

Na análise bivariada, a variável “história familiar de atopia” não se mostrou associada ao desfecho sob nenhuma das alternativas de categorização (“atopia familiar 1” e “atopia familiar 2”). Também foi testada a possível interação entre “história familiar de atopia” e “história familiar de asma”, mas o resultado não foi significativo do ponto de vista estatístico ( $p=0,53$ ).

Por outro lado, a “história familiar de asma” mostrou-se associada à SR após BVA pelo VSR, em ambas formas de categorização (“asma familiar 1” e “asma familiar 2”).

Os resultados da análise bivariada com as variáveis que foram estatisticamente associadas ao desfecho, com nível de significância de até 0,10, estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3. Análise bivariada para sibilância recorrente após bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, Vitória, Espírito Santo, 2004/6**

Variável	n (%)	RT*	IC (95%)**
Sexo do paciente			
masculino	44 (57,9)	0,83	0,68-1,03
feminino	32 (42,1)	1,00	
Hospitalização na BVA			
sim	47 (61,8)	1,39	1,11-1,76
não	29 (38,2)	1,00	
Asma familiar 1:			
asma no pai e/ou mãe	41 (63,1)	1,40	1,12-1,75
ausência de HFA	24 (36,9)	1,00	
Asma familiar 2			
asma no pai ou mãe	18 (29,1)	1,37	1,07-1,76
asma em ambos os pais	3 (4,8)	1,52	0,98-2,37
ausência de HFA	41 (66,1)	1,00	

\* RT - razão de taxas de incidência de sibilância recorrente

\*\* IC(95%) - intervalo de confiança de 95%

BVA – bronquiolite viral aguda; HFA – história familiar de asma

#### 4.3.6 Análise Multivariada

Foram selecionadas para a análise multivariada, as variáveis que se mostraram associadas ao desfecho com nível de significância de até 0,10, além da idade do paciente, em virtude da relevância desta última variável na literatura.

Quanto à história familiar de asma, optou-se pela inclusão desta variável categorizada como “asma familiar 1”. Utilizando-se a categorização “asma familiar 2” não houve modificação significativa da medida de efeito. Além disto, a categoria “asma em ambos os pais” foi observada em apenas três pacientes. Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da análise multivariada.

**Tabela 4. Análise multivariada para sibilância recorrente após bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, Vitória, Espírito Santo, 2004/6**

Variável	RT*	IC(95%)**
Idade do paciente	0,96	0,88-1,04
Sexo do paciente		
masculino	0,73	0,58-0,92
feminino	1,00	
Asma familiar 1		
asma no pai e ou mãe	1,41	1,13-1,76
ausência de HFA	1,00	
Hospitalização na BVA		
sim	1,28	0,98-1,67
não	1,00	

\* RT – razão de taxas de incidência de sibilância recorrente

\*\* IC(95%) – intervalo de confiança de 95%

BVA – bronquiolite viral aguda; HFA – história familiar de asma

No modelo final, a taxa de incidência de SR após BVA pelo VSR ajustada para idade e sexo do paciente, história familiar de asma e hospitalização do paciente à época da BVA foi de 3,6 episódios criança-ano (IC 95%, 2,6 – 4,9). Este modelo sugere que apenas o sexo do paciente e a história familiar de asma em pelo menos um dos pais (quando comparada com a ausência de história familiar de asma), estão associados ao desfecho, controlando-se as análises para a idade do paciente e a hospitalização do paciente à época da BVA.

A taxa de incidência de SR após BVA pelo VSR foi 37% maior nas meninas do que nos meninos. Evidenciou-se uma maior taxa de incidência de SR após BVA pelo VSR (41% a mais) em pacientes com história familiar de asma em pelo menos um dos pais, quando comparados a pacientes sem história familiar de asma. O efeito da hospitalização do paciente perdeu significância estatística quando controlado por idade e sexo do paciente e história familiar de asma.

#### 4.4 Caracterização das perdas de seguimento

As perdas do seguimento foram avaliadas quanto aos motivos para o abandono do seguimento e quanto ao perfil destes pacientes.

Em 80% destas perdas, o responsável pela criança nunca compareceu ao ambulatório para consultas de retorno e nos demais 20%, isto ocorreu por uma ou duas vezes apenas.

Em caso de falta à consulta, a família era contatada por telefone ou era feita visita domiciliar para remarcação da mesma, e tentativa de resgate do paciente para o projeto. Em 62% dos casos perdidos, o motivo foi recusa em continuar no estudo. Isto foi considerado quando o responsável nos comunicava sua decisão ou quando não fazia contato após as nossas ligações telefônicas ou recados deixados com parentes ou vizinhos. Em 30% dos casos houve mudança ou erro de endereço. Motivos diversos, que não os acima mencionados, contabilizaram 8% dos casos perdidos.

Estes dois grupos de pacientes mostraram-se diferentes em alguns aspectos. No grupo que não foi acompanhado, as mães fumaram mais freqüentemente na gravidez ( $p=0,010$ ), havia um maior número de fumantes no domicílio ( $p=0,004$ ) e os pais tinham menor escolaridade ( $p<0,001$ ).

## **5. DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo, realizado no Brasil, sobre sibilância recorrente após bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, de acordo com os artigos publicados até o momento. Neste sentido, não foi possível comparar os achados do presente estudo com a literatura nacional, como será relatado a seguir.

Albernaz et al.<sup>68</sup> publicaram um estudo longitudinal, aninhado à coorte de 1993, em Pelotas (Rio Grande do Sul), cujo objetivo era avaliar a hospitalização prévia por BVA como fator de risco para SR três anos após um evento agudo desta doença. Os participantes eram crianças com diagnóstico de BVA antes dos 12 meses de idade, baseado em critérios clínicos, porém sem identificação do agente etiológico. Os autores encontraram um risco cinco vezes maior de sibilância recorrente entre as crianças que foram hospitalizadas devido a BVA.

Zhang et al.<sup>84</sup> avaliaram crianças menores de 12 meses de idade, com história de BVA, primeiro episódio de sibilância, em Rio Grande (Rio Grande do Sul), até um ano após o evento agudo de doença. O objetivo era testar o uso de prednisolona oral na prevenção de SR após BVA, por qualquer etiologia, sendo que não foi demonstrada diferença entre os grupos. O uso de prednisolona oral não reduziu a prevalência de SR após BVA em um ano de seguimento dos pacientes.

Em 2006 foi publicado outro estudo sobre SR, também na cidade de Rio Grande (Rio Grande do Sul), sobre fatores de risco para SR em crianças menores de 13 anos de idade. Uma amostra de crianças menores de cinco anos de idade foi selecionada em 1997, e em 2004 estas crianças foram novamente visitadas com o objetivo de avaliar fatores de risco para SR, definida como três ou mais episódios de sibilância nos 12 meses anteriores ao estudo. Com este critério diagnóstico e a idade dos participantes, a principal doença em questão era a asma, considerando tanto os sibilantes persistentes (episódios desde a infância) quanto os sibilantes tardios (sibilância a partir dos cinco anos de idade)<sup>85</sup>.

Como relatado por Cardoso et al.<sup>86</sup>, a maioria dos trabalhos sobre doença do trato respiratório inferior, no mundo em desenvolvimento, trata de pneumonia, com poucos estudos sobre as doenças sibilantes. Dentre estas doenças sibilantes, a inclusão do termo SR após BVA faz-se importante, pois apesar do manejo do episódio agudo ser semelhante ao da asma, a evolução em longo prazo é diferente.

Uma revisão sobre seqüelas de infecções virais nos países em desenvolvimento ressalta a importância desta condição clínica. Os autores citam um trabalho desenvolvido na Argentina sobre SR que evidenciou hiper-reatividade brônquica em crianças pequenas (média de seis meses de idade no primeiro episódio de sibilância). Eles concluem que estas crianças apresentavam hiper-reatividade brônquica adquirida após a infecção viral, eram sibilantes transitórios e não deveriam ser consideradas asmáticas<sup>87</sup>.

Uma história de bronquiolite nos primeiros anos de vida é algo importante e merece atenção por parte do médico responsável pelo manejo de uma criança sibilante, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Talvez, particularidades dos países menos favorecidos economicamente devam ser consideradas. Um estudo brasileiro, em fase de publicação, desenvolvido em Uruguaiana (Rio Grande do Sul), com crianças de baixo nível sócio-econômico avaliou fatores de risco para asma aos dez anos de idade. Os resultados encontrados revelaram que na maioria dos casos a asma não era de origem atópica. As crianças com fenótipo de asma não atópica tinham uma forma leve da doença, quando comparado com os atópicos e a infecção por helmintos aumentou o risco de sibilar. Uma história de bronquiolite (etiologia não conhecida) antes dos dois anos de vida foi o principal fator de risco independente para asma e observou-se interação sinérgica entre história de bronquiolite e infecção por helmintos. Os autores sugerem que uma exposição a infecções virais e helmintos, de forma conjunta, talvez exerça um papel importante no mecanismo desta asma não atópica<sup>88</sup>.

### **5.1 Aspectos gerais do estudo**

A amostra deste estudo foi de conveniência, a partir da demanda hospitalar por atendimento em Pronto-Socorro, de crianças com quadro clínico de BVA. Foi assegurada a correta inclusão dos pacientes através da observância de rígidos critérios de inclusão dos participantes do estudo: somente crianças menores de 12 meses, apresentando um primeiro evento de sibilância e sem doenças concomitantes. Isto contribuiu para uma maior validade interna do estudo.

O estudo recrutou todas as crianças elegíveis do universo pesquisado — *o Hospital* de referência do estudo, mas se viu às voltas com dificuldades intrínsecas à clientela e aos procedimentos adotados, como descrito a seguir:

- Coleta de dados somente no período matutino, pois os espécimes clínicos deveriam ser obrigatoriamente processados no próprio dia da coleta, à tarde.
- Coleta de dados trabalhosa e demorada (coleta do espécime clínico e entrevista), possibilitando, no máximo, colher os dados de três pacientes por turno (manhã). Além disto, a criança só podia ser liberada para a coleta de dados após a confirmação do diagnóstico de bronquiolite por parte da equipe médica, o que significava esperar o atendimento médico no PS, e, quase invariavelmente, a realização de radiografia de tórax.
- Disponibilidade de tão-somente um Hospital, à época, com plenas condições para realizar o trabalho.
- Rígidos critérios de inclusão dos participantes, principalmente no tocante a ser o primeiro episódio de sibilância apresentado pela criança e não haver nenhuma doença de base, não ser prematuro e não ter utilizado ventilação mecânica no período neonatal.

Uma grande dificuldade encontrada quanto à comparabilidade de estudos epidemiológicos sobre BVA é a diversidade de critérios utilizados pelos diferentes autores, quanto à inclusão dos participantes, devido à falta de uma definição consensual deste diagnóstico <sup>74</sup>. No presente estudo, procuramos garantir este diagnóstico ao limitar a idade para menores de 12 meses, primeiro episódio de sibilância e presença de sinais e sintomas de uma infecção de vias aéreas superiores antecedendo o episódio de sibilância <sup>45</sup>. O primeiro episódio de sibilância é fato importante no diagnóstico de BVA e condição primordial para este estudo, já que o desfecho em questão é exatamente a sibilância recorrente.

Foram excluídos os pacientes que apresentavam condições clínicas associadas a um maior risco de SR, como doenças concomitantes (que aumentam o risco de uma BVA grave), prematuros e pacientes que necessitaram de ventilação mecânica durante a BVA. Estas condições clínicas representam fatores de confusão e são rotineiramente excluídas em estudos sobre SR após BVA. Devido a isto existem poucos dados a respeito da evolução em longo prazo destas crianças <sup>89</sup>. A inclusão destes pacientes poderia conduzir a uma sobre-estimação da magnitude do desfecho, já que estas condições clínicas estão associadas a recorrências frequentes de sibilância.

Os participantes foram crianças que necessitaram de atendimento de urgência durante a BVA, já que o local do estudo foi um setor de Pronto-Socorro, incluindo sala de emergência. As salas de emergência representam o local de maior identificação de VSR, quando comparados os locais de atendimento ao paciente <sup>22</sup>. Os resultados deste trabalho, portanto, não devem ser comparados com estudos realizados com pacientes atendidos em ambulatórios, que apresentam uma forma mais branda da bronquiolite. Muitas das diferenças encontradas em relação aos desfechos de estudos epidemiológicos sobre seqüelas de BVA pelo VSR podem ser explicadas pelo grau de gravidade da doença inicial e/ou local de recrutamento dos pacientes <sup>89</sup>.

## **5.2 Diagnóstico laboratorial e prevalência viral**

O diagnóstico etiológico da BVA neste estudo foi baseado na RIFI e RT-PCR.

Apesar do isolamento viral em cultura de células ser considerado o padrão ouro, a RIFI é o método recomendado pela OMS para o diagnóstico laboratorial de vírus respiratórios <sup>90</sup>. Este método apresenta boa sensibilidade e especificidade quando comparado com a cultura de células (sensibilidade de 80% a 97% e especificidade maior que 90%) <sup>91</sup>. Além disto, o isolamento viral em cultura de células necessita de uma infraestrutura laboratorial dispendiosa, com pessoal treinado, condição ainda não disponível em nosso laboratório.

A técnica de RT-PCR, quando comparada à cultura de células, tem sido apontada como uma melhor alternativa para o diagnóstico de vírus respiratórios em espécimes clínicos, devido à alta sensibilidade do método <sup>92</sup>. Um recente estudo de base populacional evidenciou que esta técnica (RT-PCR) dobrou a taxa de detecção de vírus respiratórios em crianças menores de cinco anos de idade, hospitalizadas com infecção respiratória aguda <sup>93</sup>.

Dentre as amostras de SNF das 76 crianças acompanhadas neste estudo, em 45 (59%) o resultado foi positivo pelos dois métodos laboratoriais eleitos para o diagnóstico laboratorial do VSR (RIFI ou RT-PCR). Em 23 (30%) amostras o resultado da RIFI foi inconclusivo ou negativo, mas a infecção pelo VSR foi confirmada por meio da RT-PCR. Resultado negativo na RIFI pode ocorrer por inadequada quantidade de células de descamação do epitélio da nasofaringe no espécime clínico, condição essencial para o diagnóstico de vírus respiratórios por meio de pesquisa de antígenos ou por isolamento

viral. E os resultados inconclusivos ocorrem devido à presença de grande quantidade de muco, dificultando a leitura das lâminas, com presença de fluorescência inespecífica. Em oito (10%) amostras o resultado da RIFI foi positivo para VSR, porém, foi negativo na RT-PCR. A não detecção de ácido nucléico viral em casos positivos para o antígeno, apesar de repetidas extrações, sugere que possa ter ocorrido degradação do ácido nucléico ou a presença de inibidores da reação na amostra clínica.

O VSR foi o vírus mais frequentemente identificado neste estudo. Considerando os dois métodos laboratoriais utilizados (RIFI ou RT-PCR), o VSR foi identificado em 76% dos casos. O VSR é conhecido como o principal agente etiológico da BVA, em percentuais que variam de 40% a 90%, de acordo com o estudo. Durante o pico de ocorrência do VSR, 80% ou mais dos casos de BVA estão associados a este vírus<sup>18</sup>.

O segundo vírus mais frequentemente identificado foi o hMPV, em 14% dos casos. A possibilidade de identificação de outros vírus, além do VSR nos casos de BVA é fato relevante, pois vem preencher uma importante lacuna na epidemiologia desta doença. Cerca de 15% a 35% de casos de bronquiolite e de pneumonia em pacientes pediátricos não têm o agente etiológico detectado<sup>94</sup>. Desde sua identificação em 2001<sup>95</sup>, o hMPV vem sendo descrito em diversas partes do mundo e em pacientes de todas as faixas etárias, mas principalmente associado a casos de pneumonia e bronquiolite em crianças nos primeiros anos de vida, sendo considerado como segundo agente em importância nestes casos, logo após o VSR<sup>96-99</sup>.

Um importante aspecto relatado nos estudos sobre hMPV é a possibilidade de co-infecção com o VSR. No presente estudo, a taxa de co-infecção pelo hMPV e VSR foi de 10%, considerando o total de amostras testadas para ambos os vírus. As taxas encontradas em outros trabalhos, variam de 0,5 a 10% do total de amostras<sup>96,98,100,101</sup>.

O papel do hMPV como patógeno em casos de co-infecção ainda não está adequadamente estabelecido, mas dados sugerem um aumento da gravidade da BVA. Semple et al.<sup>102</sup> evidenciaram que a co-infecção de VSR e hMPV aumentou em dez vezes o risco de internação da criança com BVA em uma Unidade de Terapia Intensiva. Alguns autores também relataram esta associação<sup>103,104</sup>, a despeito de outros trabalhos não terem encontrado diferenças em relação a infecções por um único agente<sup>98,99,105</sup>. No presente

estudo, a associação entre co-infecção por VSR e hMPV e gravidade da BVA não foi avaliada.

Além do VSR e do hMPV, foram também pesquisados os vírus Parainfluenza tipo 1, 2 e 3, Adenovírus e Vírus Influenza A e B. Destes, só identificamos os vírus Parainfluenza 1 e 3, que são os mais freqüentes dentre os vírus Parainfluenza em pacientes com BVA <sup>106</sup>. Além dos vírus aqui pesquisados, outros também são associados a BVA, como os enterovírus, coronavírus, e, principalmente, os rinovírus <sup>107</sup>.

### **5.3 Distribuição temporal do VSR**

A identificação do VSR ocorreu em todos os meses do estudo e foi proporcional ao número de casos de BVA. Este fato demonstra a relação direta entre diagnóstico de BVA e infecção pelo VSR. O aumento do número de casos de BVA em uma comunidade e internações hospitalares por esta doença é um sinal da circulação do VSR, mesmo antes de sua identificação laboratorial <sup>18</sup>.

Apesar do VSR ter sido identificado em todos os meses do estudo, foram observados picos de ocorrência distintos nos dois períodos de coleta de espécimes clínicos. No período de coleta do ano de 2004, a época de maior identificação do VSR ocorreu no mês de março, e em menor escala nos meses de abril e maio. No período de coleta do ano de 2005, a maior identificação do VSR ocorreu no mês de abril, com ápice nos meses de maio e junho e declínio no mês de julho.

A pesquisa de vírus respiratórios iniciou em Vitória (Espírito Santo) há dez anos, porém não houve coleta sistemática de amostras em todo este período. De julho de 1997 a julho de 1998, foi identificado VSR em amostras de crianças com infecção respiratória aguda em dez dos 12 meses de estudo. Porém, o pico de ocorrência foi observado no final do verão (fevereiro/março) até meados do outono <sup>24</sup>. Estes resultados coincidem com o que foi encontrado no ano de 2004. Porém, no ano de 2005, a epidemia de VSR foi mais tardia, no final do outono e início do inverno.

Estes dados sugerem dois padrões de surto de VSR para esta região, um no final do verão até meados do outono e outro mais tardio, iniciando no final do outono, se estendendo até meados do inverno. Não é possível, contudo, com este estudo, definir o

padrão de sazonalidade do VSR para esta região, sendo necessários estudos de séries mais longas de anos, desenhados para esta finalidade.

A sazonalidade do VSR no hemisfério sul revela diversos padrões, como relatado na revisão de Weber et al. <sup>5</sup>. Em países com clima temperado ou mediterrâneo, as epidemias de VSR ocorrem nos meses de inverno e parecem ser independentes do período de chuva. Já em áreas tropicais ou subtropicais, a maior circulação de VSR tem sido associada à época de chuvas. Em países próximos à linha do Equador o padrão de ocorrência não é bem definido, com surtos relatados na primeira metade do ano, porém, sem relação aparente com chuvas ou temperatura.

No Brasil, pelos dados até agora publicados, parece ocorrer, com exceção da região sul, uma circulação maior de VSR na primeira metade do ano <sup>21</sup>, como encontrado no presente estudo. Ainda não contamos no Brasil com um estudo abrangente sobre associação entre variáveis climáticas e padrão de ocorrência do VSR. Vale ressaltar que não somente a questão climática deve influenciar a dinâmica das epidemias do VSR, fatores comportamentais dos indivíduos também têm sido aventados <sup>108</sup>.

#### **5.4 Caracterização da amostra**

A amostra avaliada neste estudo revela características semelhantes às descritas por outros trabalhos, descritos a seguir. Em nosso estudo, foram acompanhadas 76 crianças menores de 12 meses de idade, com diagnóstico de BVA pelo VSR, atendidas em um setor de Pronto-Socorro, por um período de dois anos e meio após a doença aguda.

A maioria (78%) destas crianças tinha até dois meses de idade à época do diagnóstico de BVA. O intervalo da faixa etária variou de recém-nascidos até lactentes com nove meses de idade, com mediana de um mês e meio. Vale ressaltar que estes resultados referem-se a uma amostra de crianças que buscaram atendimento em Pronto-Socorro e pode não representar a distribuição da faixa etária de pacientes com BVA. Porém, os resultados aqui encontrados são semelhantes aos descritos em um grande estudo realizado em 1973, em Washington, EUA, sobre a epidemiologia do VSR <sup>6</sup>. Os autores evidenciaram ser a BVA mais freqüente entre os lactentes menores de seis meses de idade, principalmente aos dois meses. Em recente trabalho sobre fatores de risco para infecção do trato respiratório

inferior pelo VSR, realizado na Itália, com pacientes hospitalizados, a idade da criança no início da época de maior circulação do VSR (lactente menor de três meses) se mostrou fortemente associada ao desfecho <sup>109</sup>.

A BVA é doença diagnosticada nos primeiros meses de vida, com decréscimo importante até cerca de um ano e seis meses de idade, principalmente entre aqueles pacientes hospitalizados <sup>6</sup>. Isto ocorre devido a algumas características do pulmão do pequeno lactente, ainda imaturo, relativamente “mal adaptado” à vida extra-uterina. A área de troca gasosa aumenta consideravelmente nos dois primeiros anos de vida; a resistência aérea é mais elevada no neonato e lactente do que nos adultos; a parede torácica muda de forma e há diminuição da frequência respiratória com o decorrer da idade. Tudo isto faz com que a criança pequena seja mais susceptível à doença aguda bem como seqüelas em longo prazo decorrentes de enfermidades respiratórias <sup>110</sup>.

A razão masculino:feminino dos casos, no presente estudo, foi de 1,4:1. Esta maior proporção de crianças do sexo masculino é relatada por outros autores, mas não parece haver diferença em relação ao risco de desenvolver uma BVA a partir de uma infecção pelo VSR. Além da BVA, em outras síndromes em que o VSR foi o agente etiológico, também não foi possível evidenciar diferenças entre os sexos <sup>6</sup>. Em outro estudo que avaliou fatores de risco para doença respiratória aguda do trato inferior pelo VSR no primeiro ano de vida, os autores também encontraram maior proporção de pacientes do sexo masculino, quando a idade foi estratificada entre um e três meses, porém a diferença não foi estatisticamente significativa <sup>111</sup>.

A presença de um familiar da criança com infecção respiratória aguda, à época do diagnóstico de BVA, ocorreu em 68% dos casos. Esta elevada frequência de infecção respiratória no domicílio do paciente sugere a importância da dinâmica de transmissão do VSR no contexto do ambiente familiar. Um estudo longitudinal, realizado durante um surto de VSR na comunidade, em Rochester, Nova York (EUA), mostrou que a introdução do vírus no domicílio resultou em altas taxas de ataque, com 46% de infectados, considerando todas as faixas etárias, nos domicílios pesquisados. Apesar das crianças menores de 12 meses apresentarem as maiores taxas de ataque (cerca de 60%), os autores evidenciaram

que a introdução do vírus no domicílio ocorreu principalmente por meio de um irmão mais velho. Uma criança menor de 12 meses não foi, em nenhum dos casos, a única infectada na família. Quando havia apenas uma pessoa infectada no ambiente familiar, em 80% dos casos, a faixa etária dos pacientes acometidos pela infecção era de dois a dezesseis anos de idade <sup>112</sup>.

Ainda sobre transmissão do VSR no domicílio, outro dado importante é o número de habitantes por domicílio, e o número de pessoas que dividem o quarto de dormir com a criança. No presente estudo, a mediana foi de cinco pessoas por domicílio e de três para pessoas dividindo o mesmo quarto de dormir. Estes números representam medidas de aglomeração intradomiciliar e são estudados como fatores de risco para infecção pelo VSR. Um inquérito sorológico de VSR evidenciou que quando aumenta o número de habitantes por domicílio de três para seis pessoas, aumenta a proporção de indivíduos infectados em cerca de três vezes <sup>113</sup>. Holberg et al. <sup>111</sup> mostraram que o número de pessoas dividindo o mesmo quarto de dormir foi um importante risco para doença respiratória do trato inferior pelo VSR. Entre lactentes de um a três meses de idade, o risco relativo para doença do trato respiratório inferior pelo VSR foi de 1,6 para uma pessoa dividindo o quarto de dormir do paciente e de 4,7 quando este número foi de duas ou mais pessoas.

Em nossa amostra, a escolaridade materna e paterna teve mediana de oito anos de estudo concluídos com aprovação. É um número favorável, diante do fato que, considerando trabalhos brasileiros, o ponto de corte considerado como fator de risco para infecção do trato respiratório inferior pelo VSR foi de menos de cinco anos de escolaridade materna <sup>114</sup>. Albernaz et al. <sup>115</sup>, em um estudo sobre fatores de risco para hospitalização devido à BVA de qualquer etiologia, também evidenciaram associação entre escolaridade materna inferior a cinco anos e o desfecho. Porém, na análise multivariada, esta variável não permaneceu associada ao desfecho. A escolaridade paterna não se mostrou associada à hospitalização devido à BVA.

Conforme informação obtida, a grande maioria das mães das crianças participantes do presente estudo (91%) não fumou durante a gravidez. Esta variável (fumar durante a

gravidez) pode estar subestimada devido ao conhecimento geral dos malefícios do fumo durante a gravidez e medo de uma resposta positiva.

Em 35,5% dos casos havia um familiar fumante no domicílio do paciente. Não foi perguntado sobre qual familiar fumava no ambiente familiar. O fumo passivo, por parte da mãe, se mostrou associado (risco 57% maior) à hospitalização por BVA em crianças com idades entre 90 e 179 dias à época da internação hospitalar<sup>115</sup>. Em crianças na faixa etária de 28 e 89 dias à época da hospitalização não se observou associação entre fumo passivo por parte da mãe e internação hospitalar por BVA. Os autores discutem que este resultado pode indicar a importância do tempo de exposição ao fumo na relação entre esta variável e o desfecho – hospitalização por BVA.

O presente estudo não teve por objetivo estudar fatores de risco para a BVA. As variáveis aqui citadas revelam apenas as características da amostra e foram descritas porque integram a lista de fatores de risco associados à BVA, principalmente um quadro grave que leve a hospitalização do paciente.

Diversos artigos têm sido publicados sobre esta questão, principalmente em países desenvolvidos. Uma recente revisão sobre BVA pelo VSR, em pacientes saudáveis, evidenciou como fatores de risco: sexo masculino, idade inferior a seis meses, ter nascido na primeira metade da época de circulação do VSR e aglomeração (domiciliar e creches). O autor não evidenciou associação entre o desfecho e etnia, grau de escolaridade materna, nível sócio-econômico, duração do aleitamento materno e déficit nutricional<sup>116</sup>.

Em países em desenvolvimento, também parece não haver associação entre BVA e fatores de risco relacionados a condições sociais e ambientais. Weber et al.<sup>117</sup> evidenciaram como fatores de risco para uma infecção do trato respiratório inferior pelo VSR, em pacientes hospitalizados, em Gâmbia (África): aglomeração no ambiente familiar, ter um irmão falecido e nacionalidade do pai (não ser de Gâmbia). O principal fator de risco foi a aglomeração. Quando esta aglomeração foi estratificada por número e idade dos irmãos, foi evidenciado maior risco quando havia duas ou mais crianças, entre três e cinco anos de idade, documentando mais uma vez a importância da introdução do VSR na família por irmãos mais velhos. As medidas apontadas quanto à prevenção das infecções agudas do trato respiratório inferior incluem o manejo adequado da doença, a prevenção pela

vacinação e a identificação e controle dos fatores de risco. Os autores comentam que, no caso do VSR, esforços deveriam ser concentrados no sentido do controle da doença e vacinação, já que associações relevantes com fatores sociais ou ambientais não foram evidenciadas.

## **5.5 Estudo longitudinal**

### **5.5.1 Taxa de incidência de sibilância recorrente**

O presente estudo evidenciou uma taxa de incidência de SR após BVA pelo VSR bruta de 3,7 episódios por criança-ano, ao longo de dois anos e meio de acompanhamento dos pacientes. Este achado evidencia uma importante morbidade respiratória nos anos subsequentes a um evento agudo de bronquiolite pelo VSR, como relatado em outros estudos, tanto em pacientes hospitalizados durante a doença aguda, em países desenvolvidos<sup>58-61,63,66,118</sup>, como aqueles entre pacientes de países em desenvolvimento<sup>62,67,80</sup>. A SR após uma infecção respiratória do trato inferior pelo VSR também foi evidenciada em pacientes com doença menos grave, que não levou a internação hospitalar<sup>69</sup>.

Ainda não se sabe ao certo se esta morbidade respiratória, com episódios recorrentes de sibilância, em países em desenvolvimento ou em região tropical, teria um padrão diferente dos países desenvolvidos, em termos de duração e gravidade.

Osundwa et al. evidenciaram em Qatar (Golfo Árabe), SR após BVA pelo VSR em proporções semelhantes aos de países desenvolvidos: 44% das crianças com bronquiolite pelo VSR antes de 12 meses de idade tiveram SR nos dois anos seguintes ao evento agudo da doença, comparado com 13% das crianças do grupo controle<sup>62</sup>.

Cifuentes et al., em estudo realizado no Chile, encontraram uma taxa de incidência de SR após BVA pelo VSR de 3,36 episódios criança-ano, após 12 meses de seguimento de pacientes menores de 24 meses à época da bronquiolite<sup>67</sup>. Porém, não houve diferença significativa quando estas crianças foram comparadas com um grupo controle composto de pacientes que tiveram resultado negativo para VSR.

No estudo realizado em Gâmbia (África), foi evidenciada uma taxa de incidência de SR após uma infecção respiratória aguda do trato inferior pelo VSR de 8,4 episódios por 100 crianças-ano, aos 12 meses de idade. Esta taxa caiu abruptamente para 0,1 episódio por 100 crianças-ano aos três anos de idade. Os autores comentam que, talvez, em países em desenvolvimento, as seqüelas de uma infecção pelo VSR teriam uma duração mais breve <sup>80</sup>. Além disto, eles ressaltam que o principal achado do estudo foi o elevado risco de infecção do trato respiratório inferior sem sibilância (pneumonia), nos anos subseqüentes à infecção pelo VSR (tempo de seguimento, em média, de 25 meses). Eles concluem que as seqüelas de uma infecção do trato respiratório inferior pelo VSR em países em desenvolvimento podem ser diferentes das descritas nos países desenvolvidos <sup>80</sup>.

No presente estudo, os resultados obtidos referem-se a um período de dois anos e meio de seguimento dos pacientes. A evolução desta condição clínica no decorrer do tempo deverá ser objeto de estudo posterior.

Em países desenvolvidos, há coortes acompanhadas por longo período de tempo que evidenciam SR muitos anos após um evento agudo de BVA ou de uma infecção respiratória aguda do trato inferior pelo VSR. Sigurs et al. <sup>66</sup>, na Suécia, apresentaram resultados de pacientes aos 13 anos de idade, que tiveram BVA pelo VSR antes dos 12 meses de vida. Anteriormente, estes pacientes tinham sido avaliados com um, três e sete anos de idade. Na adolescência, aos 13 anos, observou-se uma forte associação entre BVA pelo VSR na infância e sintomas de asma e alergia. No estudo longitudinal de Tucson, Arizona (EUA) os autores evidenciaram um risco aumentado para SR após infecção respiratória aguda do trato inferior pelo VSR antes dos três anos de idade, em crianças de até seis anos. Porém, este risco declinou com o decorrer da idade, chegando a níveis irrelevantes aos 13 anos <sup>69</sup>. Vale ressaltar que estes pacientes se distinguiam daqueles da coorte anterior, de Sigurs et al., uma vez que se tratava de crianças menores de três anos de idade à época da infecção pelo VSR, que não foram hospitalizadas.

No Brasil, as informações até agora disponíveis, são as da coorte de Pelotas (Rio Grande do Sul), iniciada em 1993. As crianças hospitalizadas por BVA (qualquer etiologia), antes dos 12 meses de idade apresentaram um risco cinco vezes maior de SR aos três anos, quando comparadas com os controles <sup>68</sup>.

Os episódios de sibilância após BVA pelo VSR, apesar de freqüentes, têm sido relatados como leves, não exigindo internação hospitalar do paciente, e ausentes por longo período de tempo <sup>58</sup>. Este aspecto da SR não costuma ser abordado nos artigos pertinentes. No presente estudo, em 8% dos casos fez-se necessária a hospitalização devido a episódios de sibilância, em algum momento do período de acompanhamento. Em todos os casos (seis crianças) de internação, houve o relato de somente uma internação por cada paciente. Uma taxa semelhante (7%) de hospitalização por doença respiratória, acompanhada de sibilância, foi relatada em um estudo longitudinal de seguimento de crianças após infecção respiratória aguda do trato inferior pelo VSR <sup>63</sup>. Em uma revisão sobre seqüelas em longo prazo de BVA, o autor cita que 10% a 15% dos pacientes serão hospitalizados por uma doença respiratória aguda ao longo dos dois anos subseqüentes a uma BVA (considerando qualquer etiologia) <sup>46</sup>.

Não resta dúvida da evidente morbidade respiratória, principalmente SR, após uma infecção respiratória aguda do trato inferior pelo VSR, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, apesar de ainda existirem poucos dados oriundos destes últimos.

Um dado relevante, recentemente abordado, é a qualidade de vida destes pacientes durante os anos que se seguem a um evento agudo de infecção do trato respiratório inferior pelo VSR. Bont et al. <sup>119</sup> aplicaram um questionário utilizado para medir a qualidade de vida relacionada à saúde de crianças de um a cinco anos de idade, em pacientes que tiveram infecção aguda do trato respiratório inferior pelo VSR antes dos 13 meses de vida. Foram entrevistados os pais de 128 crianças do grupo índice e 340 do grupo controle. Os autores evidenciaram uma pior qualidade de vida no grupo índice, quando comparada com o grupo controle, em tópicos relacionados a problemas gástricos, pulmonares, do sono, do apetite e alimentares. Os autores discutem os possíveis motivos para estes resultados, mas o que chama a atenção é a constatação da importância da infecção pelo VSR no pequeno lactente quanto à sua qualidade de vida, não somente no que se refere aos problemas respiratórios, mas também em vários outros aspectos da saúde infantil.

### 5.5.2 Análise dos fatores de risco para sibilância recorrente

Neste estudo foram analisados os seguintes fatores de risco associados a SR após BVA pelo VSR: a idade da criança à época da BVA, o sexo do paciente, a hospitalização do paciente durante a BVA, o hábito de fumar por parte da mãe durante a gravidez, a presença de familiar fumante no domicílio do paciente e a história familiar (nos pais) de atopia (rinite alérgica) e asma. A seleção destes fatores foi realizada com base em resultados anteriormente publicados<sup>58-61,63,64,67,69,75,118</sup>.

Apesar de diversos autores direcionarem seus estudos no sentido de identificar fatores de risco para SR após BVA pelo VSR, estes ainda não são bem conhecidos e resultados conflitantes vêm sendo publicados. Ainda não sabemos porque algumas crianças são mais propensas do que outras para desenvolver SR após BVA pelo VSR.

A idade da criança à época da BVA é uma variável importante e considerada com muita frequência nos estudos epidemiológicos sobre SR. Isto porque, tendo os eventos fisiopatológicos da BVA ocorrido em uma época muito recente da vida da criança, com um pulmão ainda imaturo, poderia haver alterações da árvore brônquica e seqüela respiratória daí decorrente. Porém, esta associação entre idade da criança à época da BVA e SR não é fato esclarecido. No presente estudo, observou-se uma tendência no sentido de uma menor taxa de incidência de SR em crianças mais velhas à época da BVA, porém, esta associação não se mostrou significativa. Outros estudos também não evidenciaram tal associação<sup>58,68</sup>. Porém, Cifuentes et al.<sup>67</sup> encontraram no grupo VSR negativo uma associação entre idade e SR. Crianças mais velhas à época da BVA vieram a ter menos frequentemente SR no ano seguinte. Porém, isto não ocorreu no grupo VSR positivo.

Crianças do sexo feminino tiveram maior taxa de incidência anual de SR após BVA pelo VSR, se comparadas a crianças do sexo masculino. Diferentes resultados são relatados na literatura a este respeito. Alguns autores não encontraram diferença estatisticamente significativa entre sexo do paciente e SR após BVA pelo VSR<sup>58,68</sup>. No primeiro estudo, os autores estratificaram o grupo de crianças que tiveram BVA pelo VSR de acordo com o desfecho (crianças com SR e crianças sem SR, oito anos após a bronquiolite), e não

evidenciaram diferença em relação ao sexo do paciente. Pullan & Hey, ao contrário, relataram, dez anos após uma infecção respiratória aguda do trato inferior pelo VSR, que a SR ocorria principalmente em meninas com poucos sinais de atopia<sup>59</sup>. Welliver et al.<sup>120</sup> relataram que crianças do sexo masculino apresentaram um risco três vezes maior do que crianças do sexo feminino de ter SR após BVA pelo VSR.

Estes resultados mostram que não há, até o momento, uma conclusão definitiva a respeito de uma associação entre sexo do paciente e SR após BVA pelo VSR. Em 1988 foi publicado um estudo longitudinal que avaliou a função pulmonar de lactentes antes de apresentarem qualquer infecção respiratória aguda do trato inferior. Os autores mostraram que, para ambos os sexos, uma diminuição da função pulmonar se mostrou associada a um maior risco de sibilar quando estes pacientes apresentavam uma infecção respiratória aguda do trato inferior. Porém, no caso dos meninos, a alteração significativa foi uma menor condutância das vias aéreas, ao passo que, nas meninas, tratava-se de uma diminuição da capacidade residual funcional do pulmão. Portanto, parece que, lactentes de ambos os sexos têm maior risco de sibilar, desde que apresentem uma diminuição da função pulmonar ao nascimento devido a aspectos fisiopatológicos distintos<sup>72</sup>.

A hospitalização do paciente à época da BVA tem sido apontada como um fator de risco para o desenvolvimento de SR após BVA. No presente estudo, a hospitalização prévia do paciente mostrou-se associada ao desfecho, aumentando a taxa de incidência anual de SR. Porém, esta associação deixou de ser significativa, na análise multivariada, controlando-se para o sexo do paciente e história familiar de asma. Albernaz et al.<sup>68</sup> evidenciaram um risco cinco vezes maior de SR em pacientes que foram hospitalizados por BVA (sem especificação da etiologia), quando comparados com um grupo controle de crianças não hospitalizadas. Outro estudo também evidenciou um risco maior de SR em crianças que foram hospitalizadas à época da BVA pelo VSR, quando comparadas com aquelas que não foram internadas<sup>67</sup>. Esta associação entre hospitalização prévia do paciente e SR não é estudada com frequência, uma vez que a maioria dos trabalhos é realizada com pacientes internados. Em nosso estudo é possível supor que a não associação entre esta variável e o desfecho SR se deva às características da amostra. Todas as crianças participantes do estudo tiveram uma BVA grave o suficiente para um atendimento no setor de Pronto-Socorro. Algumas necessitaram de hospitalização (mais de 24h dentro do hospital), outras,

tão somente do atendimento de urgência, sendo a seguir liberadas. Portanto, a comparação não foi realizada entre crianças com uma BVA grave e outras com BVA leve, acompanhadas em ambulatório, mas sim exclusivamente entre crianças com uma BVA que exigiu cuidados em ambiente hospitalar.

Neste estudo não foi evidenciada associação entre o desfecho SR após BVA pelo VSR e variáveis relacionadas ao hábito de fumar (fumo por parte da mãe durante a gravidez e presença de fumante no domicílio do paciente).

No estudo longitudinal sobre problemas respiratórios em crianças de Tucson, Arizona (EUA), os autores evidenciaram que o risco de sibilância (por qualquer causa), nos três primeiros anos de vida estava associado ao hábito da mãe de fumar durante a gravidez<sup>121</sup>. Uma explicação para este fato seria a associação entre fumo materno na gravidez e diminuição da função pulmonar durante o primeiro ano de vida<sup>122</sup>. Se a associação entre fumo materno durante a gravidez e sibilância também existe quanto à SR após BVA pelo VSR isto ainda não foi estabelecido de forma clara. No presente estudo, houve poucos casos em que a mãe fumou durante a gravidez (9%), de acordo com as informações coletadas, e isto pode ter conduzido ao resultado obtido.

No estudo de Tucson, evidenciou-se que o fumo materno ou paterno no domicílio da criança não estava associada à sibilância (por qualquer causa), na primeira década de vida<sup>121</sup>. No presente estudo, não foi evidenciada associação com a presença de fumantes no domicílio do paciente e SR após BVA pelo VSR. Estes resultados estão em consonância com os publicados por outros autores<sup>63,75</sup>. Sly et al.<sup>61</sup> verificaram a ocorrência de sintomas sugestivos de asma após uma bronquiolite pelo VSR, em crianças cujos pais eram fumantes. Porém, esta associação não foi significativa do ponto de vista estatístico.

A associação entre antecedentes familiares de atopia ou de asma e o desenvolvimento de SR após BVA pelo VSR é assunto em debate, e ainda não definido. No presente estudo foi investigada a associação entre atopia familiar, nos pais, apresentada como rinite alérgica, bem como história familiar de asma nos pais, e o desenvolvimento de SR após BVA pelo VSR.

Não foi evidenciada associação entre história familiar de atopia (rinite alérgica) e SR. Este resultado está de acordo com outras publicações<sup>59-61,69,123</sup>.

Mas, a despeito do resultado referente à história familiar de atopia, no presente estudo, a taxa de incidência anual de SR após BVA pelo VSR foi maior entre as crianças com história familiar de asma. Esta associação não foi evidenciada por alguns autores<sup>60,61,63,68</sup>. Welliver & Duffy, por seu turno, relataram associação entre história familiar de asma e SR após BVA pelo VSR<sup>75</sup>. Também no estudo longitudinal sueco, os autores evidenciaram que uma história familiar de asma em crianças que tiveram uma BVA pelo VSR aumentou o risco para asma (definida como três ou mais episódios de sibilância verificados por um médico), aos três anos de idade, ainda que esta associação não tenha permanecido significativa quando as crianças completaram sete anos e meio de idade<sup>74</sup>. Porém, quando essas crianças completaram treze anos, dois fatores de risco independentes para asma foram identificados: uma história de BVA pelo VSR na infância e história familiar de asma<sup>66</sup>. Além disto, estes autores também evidenciaram uma forte associação entre BVA pelo VSR no primeiro ano de vida e sensibilização alérgica na adolescência. Estes resultados estão em desacordo com o que foi publicado por outro grande estudo longitudinal, o de Tucson, Arizona (EUA)<sup>69</sup>. É possível que diferenças relativas aos critérios de inclusão das crianças nos estudos, como idade em que ocorreu a BVA pelo VSR e gravidade da doença possam explicar as diferenças nos achados entre estas duas coortes.

No presente estudo, não encontramos associação entre SR após BVA pelo VSR e atopia (rinite alérgica) nos pais, porém, evidenciamos associação com asma nos pais. É possível que estes achados sejam um indício de que a história de asma nos pais pode não ter origem atópica em alguns casos. No questionário utilizado para aferir história familiar de asma, de acordo com o III Congresso Brasileiro no Manejo da Asma (2002)<sup>83</sup>, as perguntas se referiam a episódios de sibilância atuais ou progressos. Ou seja, foi considerada sibilância que ocorria na infância ou adolescência. Alguns pais podem ter sibilado tardiamente em decorrência de uma bronquiolite anterior pelo VSR e não por uma asma clássica, atópica. Outro fato que corrobora esta explicação é que não se observou correlação entre atopia familiar e asma familiar, bem como pelo fato de não haver interação entre estas duas variáveis e o desfecho.

## 5.6 Limitações do estudo

Uma limitação importante do presente estudo é decorrente das perdas de pacientes após o arrolamento. Devido às diferenças entre o grupo de pacientes acompanhados e o grupo daqueles que abandonaram o seguimento, os resultados deste estudo não podem ser estendidos ao conjunto de pacientes arrolados.

A perda de pacientes ao longo do seguimento constitui um dos principais problemas dos estudos longitudinais. A falta de informação acerca dos elementos perdidos pode conduzir a uma mensuração inadequada da medida de efeito (em caso de perda diferencial). Além disto, a validade do estudo pode estar comprometida se as perdas estiverem associadas ao desfecho<sup>124</sup>. No presente estudo, não é possível afirmar se as perdas foram aleatórias ou influenciadas por algum viés sistemático. A investigação que empreendemos acerca das razões subjacentes às perdas não sugere serem estas dependentes do desfecho, mas não há como assegurar isto.

Outra limitação deste estudo é decorrente do reduzido número de crianças efetivamente acompanhadas. Embora tenha sido possível conduzir análises multivariadas, não é possível afirmar que as associações que não foram evidenciadas corresponderam, efetivamente, a associações inexistentes, já que é possível que a falta de poder estatístico tenha impedido a verificação e análise de associações que eventualmente existiram (erro beta).

## 5.7 Contribuições do estudo

Este estudo é uma contribuição às investigações sobre SR após BVA pelo VSR e possíveis associações com fatores de risco. Como assinalado anteriormente neste texto, não se sabe ainda se as seqüelas de uma bronquiolite pelo VSR ocorrem por lesão direta do vírus ou como consequência da resposta imunológica do hospedeiro, ou ainda devido a condições pré-existentes nos indivíduos. Também não foi definida a relação entre esta infecção e possíveis fatores de risco. Portanto, este estudo vem acrescentar informações a estas pesquisas, principalmente, no mundo em desenvolvimento.

Outra importante contribuição deste estudo refere-se à prática pediátrica. A SR após BVA deve ser considerada no manejo do lactente sibilante. O quadro clínico é semelhante

ao da asma brônquica, porém, com evolução diferente, ao longo do tempo. Um adequado conhecimento desta condição clínica pode favorecer o pediatra no reconhecimento da doença, implicando maior segurança no acompanhamento do paciente e na prescrição correta de medicamentos e orientações aos pais.

## **6. CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES:

- O Vírus Sincicial Respiratório foi o vírus mais frequentemente identificado neste estudo, em crianças menores de 12 meses de idade com bronquiolite viral aguda, mostrando a relevância deste vírus como agente etiológico desta condição clínica.
- O Metapneumovírus humano foi o segundo vírus mais frequentemente identificado nesta mesma amostra. A pesquisa de outros vírus na etiologia da bronquiolite constitui fato relevante, pois vem preencher uma importante lacuna na epidemiologia desta doença.
- O estudo longitudinal evidenciou uma importante morbidade respiratória, com episódios recorrentes de sibilância ao longo dos 30 meses subsequentes ao evento agudo de bronquiolite.
- Apesar de freqüentes, estes episódios não conduziram a hospitalizações na maioria das vezes.
- A análise dos fatores de risco evidenciou uma associação do sexo do paciente com o desfecho, tendo as meninas sibilado mais frequentemente que os meninos, bem como aqueles pacientes com uma história de asma em ao menos um dos pais, frente aos que não tinham esse histórico familiar.
- As características da amostra revelaram um padrão geralmente descrito por outros autores, reafirmando ser a bronquiolite uma doença da criança nos primeiros meses de vida, em sua maioria, do sexo masculino e com um familiar apresentando uma infecção respiratória aguda concomitante.
- A escolaridade dos pais se mostrou satisfatória, frente aos padrões brasileiros, bem como o fato da maioria das mães não ter fumado na gravidez.

- Este é o primeiro trabalho brasileiro sobre sibilância recorrente após bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, segundo as publicações pertinentes. Isto demonstra a importância dos resultados aqui apresentados, acrescentando informações às pesquisas sobre a epidemiologia deste vírus , principalmente em nosso país.
- Para a prática pediátrica fica o alerta da importância do reconhecimento da sibilância recorrente após bronquiolite viral aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório, incluindo esta condição clínica no manejo do lactente sibilante.

## **7. ANEXOS**

## ANEXO 1

### **Procedimento técnico para coleta de espécime clínico para pesquisa de vírus respiratórios.**

1. Preencher a ficha epidemiológica com os dados do paciente.
2. Cortar o equipo de infusão de soro, a partir do “copinho”, deixando em torno de 20cm de comprimento.
3. Conectar a extremidade cortada do equipo a uma sonda de aspiração nº 6.
4. Conectar a outra extremidade do equipo a um aspirador de parede ou manual.
5. Aspirar a secreção de nasofaringe. Aspirar as duas narinas alternadamente, com movimentos constantes e manuseio cuidadoso para evitar sangramentos.
6. Guardar o equipo e a sonda conectada, dentro da própria embalagem plástica do equipo.
7. Fechar a embalagem com fita crepe.
8. Identificar a amostra com o nome completo do paciente, hora e local da coleta.
9. Armazenar a amostra em geladeira até o momento do transporte.
10. Transportar a amostra para o laboratório dentro de uma caixa térmica ou caixa de isopor com gelo.
11. Enviar a amostra e a ficha do paciente ao laboratório no mesmo dia da coleta.

## ANEXO 2

**Questionário:**

- 1) Nome da criança: \_\_\_\_\_
- 2) N° do prontuário: \_\_\_\_\_
- 3) Hospital: \_\_\_\_\_ Setor: \_\_\_\_\_
- 4) Nome da mãe / responsável: \_\_\_\_\_
- 5) Endereço residencial: R: \_\_\_\_\_  
N°: \_\_\_\_\_ complemento: \_\_\_\_\_ bairro: \_\_\_\_\_
- Município: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_
- 6) Ponto de referência: \_\_\_\_\_
- 7) Telefone: n°: \_\_\_\_\_ ( ) residencial ( ) comercial ( ) recado  
Se recado, falar com \_\_\_\_\_

**Sobre a criança:**

- 8) Data de nascimento da criança: \_\_\_\_\_
- 9) Sexo: M ( ) F ( )
- 10) Peso de nascimento: \_\_\_\_\_
- 11) Comprimento ao nascimento: \_\_\_\_\_
- 12) O seu bebê foi a termo? Sim ( ) Não ( ) IG semanas
- 13) A criança usou oxigênio durante o período neonatal?  
Sim ( ) Não ( ) Não sabe ( ) Por quanto tempo? horas ou dias
- 14) A criança necessitou de ventilação mecânica durante o período neonatal?  
Sim ( ) Não ( ) Não sabe ( ) Por quanto tempo? horas ou dias
- 15) A criança já teve o diagnóstico de fibrose cística? Sim ( ) Não ( )
- 16) A criança já teve o diagnóstico de displasia bronco-pulmonar? Sim ( ) Não ( )
- 17) A criança já teve o diagnóstico de cardiopatia congênita? Sim ( ) Não ( )
- 18) A criança recebeu aleitamento materno exclusivo? (sem água, chás ou sucos)  
Sim ( ) Não ( ) Por quanto tempo? dias ou meses
- Está em aleitamento materno exclusivo no momento ( )
- 19) A criança freqüente creche? Sim ( ) Não ( ) Período: horas/dia

**Sobre a transmissão da infecção:**

- 20) Tem algum familiar no momento com infecção respiratória?  
Sim ( ) Não ( ) Não sabe ( )
- 21) Quantas pessoas moram em casa? \_\_\_\_\_
- 22) Quantas pessoas dormem no mesmo quarto que a criança? \_\_\_\_\_

**Escolaridade materna e paterna:**

- 23) A senhora lê e escreve? Sim ( ) Não ( )
- 24) Qual a última série que a senhora concluiu com aprovação?  
N° da série: N° do grau: \_\_\_\_\_
- 25) O pai da criança lê e escreve? Sim ( ) Não ( )

26) Qual a última série que o pai da criança concluiu com aprovação?

Nº da série: Nº do grau:

### Sobre hábitos comportamentais:

27) A senhora ingeriu bebida alcoólica durante a gravidez? Sim ( ) Não ( )

Com qual frequência?

Raras vezes (até **3 vezes** num mês típico) ( )

Somente nos finais de semana ( )

Freqüentemente (várias vezes por semana, mas não diariamente) ( )

Diariamente ( )

Qual bebida alcoólica?

Whisky/ Cachaça/Vodca ( ) Vinho ( ) Cerveja ( )

28) A senhora fumava antes da gravidez? Sim ( ) Não ( )

29) A senhora fumou durante a gravidez? Sim ( ) Não ( )

Qual período? Durante toda a gestação ( ) Parou no 1º mês ( )

30) Quantos cigarros a senhora fumava por dia, durante a gestação?

31) A senhora fuma agora? Sim ( ) Não ( )

32) Alguém fuma na casa da criança? Sim ( ) Não ( )

### Sobre rinite alérgica e asma brônquica:

33) A senhora apresenta ou já apresentou alguns destes sintomas?

- Espirros freqüentes (em salva): Sim ( ) Não ( )
- Coriza freqüente: Sim ( ) Não ( )
- Prurido nasal freqüente: Sim ( ) Não ( )
- Obstrução nasal freqüente: Sim ( ) Não ( )

34) O pai da criança apresenta ou já apresentou alguns destes sintomas?

- Espirros freqüentes (em salva): Sim ( ) Não ( )
- Coriza freqüente: Sim ( ) Não ( )
- Prurido nasal freqüente: Sim ( ) Não ( )
- Obstrução nasal freqüente: Sim ( ) Não ( )

35) A senhora:

- Tem ou teve episódios recorrentes de dispnéia (falta de ar)? Sim ( ) Não ( )
- Tem ou teve crises ou episódios recorrentes de sibilância? Sim ( ) Não ( )
- Tem tosse persistente, particularmente à noite ou ao acordar? Sim ( ) Não ( )
- Acorda por falta de ar? Sim ( ) Não ( )
- Tem tosse, sibilância ou aperto no peito após atividade física? Sim ( ) Não ( )
- Tem tosse, sibilância ou aperto no peito após exposição a mofo, poeira domiciliar, animais domésticos ou a irritantes como fumaça de cigarro e perfumes ou depois de resfriados ou alterações emocionais como riso ou choro **ou com mudanças climáticas**? Sim ( ) Não ( )
- Usa alguma medicação quando os sintomas ocorrem? Sim ( ) Não ( )  
Com que frequência? **x** por dia **x** por semana **x** por mês
- Há alívio dos sintomas após o uso de medicação? Sim ( ) Não ( )

36)O pai da criança:

- Tem ou teve episódios recorrentes de dispnéia (falta de ar)? Sim ( ) Não ( )
- Tem ou teve crises ou episódios recorrentes de sibilância? Sim ( ) Não ( )
- Tem tosse persistente, particularmente à noite ou ao acordar? Sim ( ) Não ( )
- Acorda por falta de ar? Sim ( ) Não ( )
- Tem tosse, sibilância ou aperto no peito após atividade física? Sim ( ) Não ( )
- Tem tosse, sibilância ou aperto no peito após exposição a mofo, poeira domiciliar, animais domésticos ou a irritantes como fumaça de cigarro e perfumes ou depois de resfriados ou alterações emocionais como riso ou choro **ou com mudanças climáticas?** Sim ( ) Não ( )
- Usa alguma medicação quando os sintomas ocorrem? Sim ( ) Não ( )  
Com que frequência? **x** por dia **x** por semana **x** por mês
- Há alívio dos sintomas após o uso de medicação? Sim ( ) Não ( )

**Sobre a doença atual da criança:**

37)Quando começaram os primeiros sintomas da doença atual, como coriza, tosse seca e febre baixa? há dias

38) Dados da anamnese e do exame físico:

**perguntas feitas à mãe e anotações do prontuário médico**

- Coriza: Sim ( ) Não ( )
- Obstrução nasal: Sim ( ) Não ( )
- Febre: Sim ( ) Não ( )
- Tosse: Sim ( ) Não ( )
- Conjuntivite: Sim ( ) Não ( )
- Gemência: Sim ( ) Não ( )
- Roncos: Sim ( ) Não ( )
- Sibilos: Sim ( ) Não ( )
- Estertores crepitantes: Sim ( ) Não ( )
- Cianose: Sim ( ) Não ( )
- Tiragens intercostais ou subcostais: Sim ( ) Não ( )
- FR: irpm FC: bpm

**39)Resultado da radiografia de tórax? Normal Sim ( ) Não ( )**

- Hiperinsuflação pulmonar: Sim ( ) Não ( )
- Atelectasia: Sim ( ) Não ( )
- Consolidações: Sim ( ) Não ( )
- Inf. Intersticial: Sim ( ) Não ( )

Entrevistador: \_\_\_\_\_

Data:

### ANEXO 3

#### Procedimento técnico para processamento de secreção de nasofaringe

1. Retirar a amostra da caixa térmica e/ou caixa de isopor com gelo e colocá-la na geladeira.
2. Cadastrar a amostra no livro de registro com os dados da ficha epidemiológica do paciente.
3. Separar o material necessário na cabine de segurança: pipetas Pasteur, tubos *ependorff*, meios de transporte viral: MEM (*Minimum Essential Medium*) e MEM + BSA (*Bovine Albumin Fraction V*), tubos contendo antibióticos (penicilina + estreptomicina) e fungicida (anfotericina B), tubo cônico p/ centrifuga de 15ml, béquer com PBS (tampão salina fosfato), luvas de látex, recipiente plástico para depósito de material contaminado (*Descarpak*) contendo água, coletor de lixo contaminado e sacola de lixo branca.
4. Organizar o material na cabine de segurança, de tal forma que o material contaminado não seja deslocado sobre o material estéril. Todo o material estéril deverá ficar do lado esquerdo do operador e o material contaminado do lado direito.
5. Colocar cerca de 5ml de PBS no tubo cônico de 15ml e identificá-lo com o mesmo código que a amostra recebeu no livro de registro.
6. Identificar três tubos *ependorff* com o código da amostra e o tipo de meio que ele vai receber (um tubo com MEM e dois tubos com MEM+BSA).
7. Com uma pipeta Pasteur colocar cerca de 1ml de MEM e MEM+BSA em seus respectivos tubos. Desprezar a pipeta no *Descarpak*.
8. Adicionar, aos tubos com os meios, 2 gotas de fungicida e 2 gotas de antibiótico.
9. Retirar a amostra do plástico, descartar o plástico no lixo contaminado.
10. Aspirar a sonda c/ pipeta Pasteur, a fim de retirar pequenas quantidades do material clínico. Adicionar este material em primeiro lugar ao tubo com MEM e depois aos tubos com MEM+BSA. Desprezar a pipeta no *Descarpak*.
11. Adaptar a pêra de aspiração ao equipo de soro cortado conectado à sonda e promover sua lavagem em PBS contido no tubo de 15ml. Desprezar a sonda e equipo no lixo contaminado.
12. Com uma pipeta Pasteur, promover a homogeneização da solução (PBS + material clínico), com movimentos de aspiração e ejeção da mesma. Na seqüência, retirar

grumos e adicionar mais PBS até conseguir uma perfeita diluição do material. Os grumos devem ser desprezados no *Descarpak*, bem como a pipeta utilizada nesta etapa.

13. Retirar as luvas; colocá-las dentro da sacola branca, amarrar a sacola, fechar o recipiente e retirá-lo da cabine de segurança. Retirar também o *Descapark*. Encaminhar estes recipientes para a sala de lavagem de material.
14. Levar o tubo de 15ml, contendo o material clínico para centrifugar por 10 min a 1500 rpm.
15. Conduzir os meios com material clínico para Sala Fria (-70° C).
16. Identificar as lâminas de imunofluorescência com o mesmo código da amostra (o número de lâminas dependerá da quantidade de sedimento obtido).
17. Retirar o tubo da centrífuga, desprezar o sobrenadante e re-suspender o sedimento, adicionando três gotas de PBS.
18. Utilizando uma pipeta Pasteur, preencher com o sedimento todos os círculos das lâminas de imunofluorescência.
19. Secar as lâminas na cabine de segurança em funcionamento.
20. Fixar as lâminas em acetona gelada por 10min. Posteriormente, deixá-las em geladeira até evaporação de toda a acetona.
21. Guardá-las em geladeira, se for realizada a reação de imunofluorescência indireta no dia seguinte, caso contrário, guardá-las em freezer a -70° C.

Nota: O operador deve estar devidamente paramentado de acordo com as normas de segurança biológica, com jaleco e luvas.

## ANEXO 4

### Procedimento técnico para a realização da reação de imunofluorescência indireta

1. Retirar o kit de diagnóstico da geladeira para se adaptar à temperatura ambiente.
2. Retirar as lâminas do freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  ou da geladeira.
3. Adicionar uma gota ( $25\ \mu\text{L}$ ) de anticorpo monoclonal específico para cada um dos sete vírus pesquisados: Adenovirus, Influenza A, Influenza B, VSR, Parainfluenza tipo 1, 2 e 3 em cada círculo, conforme padronização do laboratório. Adicionar em um dos círculos uma gota ( $25\ \mu\text{L}$ ) de um pool destes anticorpos monoclonais (*scrrening*).
4. Levar as lâminas para incubação, em câmara úmida a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min.
5. Lavar as lâminas por imersão, em PBS, por cinco minutos. Repetir este procedimento por três vezes.
6. Posicionar as lâminas verticalmente sobre uma folha de papel toalha para escorrer o excesso de PBS.
7. Adicionar uma gota de conjugado (*anti-mouse*) IgG, marcado com isotiocianato de fluoresceína), sobre cada círculo contendo o material clínico com o anticorpo monoclonal específico.
8. Novamente levar as lâminas para incubação em câmara úmida a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min e após este período, proceder à lavagem da mesma forma, conforme descrito acima. Ao final, imergir rapidamente cada lâmina em água destilada.
9. Novamente posicionar as lâminas sobre uma folha de papel toalha para a retirada do excesso de PBS.
10. Adicionar uma gota de fluido de montagem sobre o centro de cada lâmina.
11. Cobrir a lâmina com uma lamínula de vidro, cuidadosamente colocada, a fim de evitar formação de bolhas de ar entre as duas superfícies.
12. Proceder a leitura das lâminas em microscópio de fluorescência de epi-iluminação (Olympus Optical CO., Tóquio, Japão) com objetiva de 40x e ocular de 10x.

## **Interpretação dos resultados**

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) será considerada positiva quando apresentar três ou mais células intactas por campo, mostrando os seguintes padrões específicos de fluorescência:

- vírus Influenza – fluorescência presente somente no núcleo, no citoplasma ou em ambos.
- vírus Parainfluenza – fluorescência citoplasmática com aspecto de grânulos finos.
- VSR – fluorescência exclusivamente citoplasmática. Corpúsculos de inclusão e partículas finas fluorescentes podem estar presentes.
- Adenovírus – tipo variável de fluorescência, geralmente consistindo em uma fluorescência nuclear e citoplasmática.

A fluorescência é reconhecida como uma coloração verde-maçã intensa, sempre localizada no interior da célula. O padrão de coloração é geralmente granular, porém, grandes inclusões podem estar homogeneamente coradas. Qualquer coloração extracelular ou fragmentos de células mostrando fluorescência devem ser considerados inespecíficos.

A amostra será considerada negativa para RIFI na ausência de fluorescência específica e o predomínio de uma coloração avermelhada nas células devido à presença do corante azul de Evans no conjugado.

## ANEXO 5

### **Diagnóstico molecular para detecção de genoma viral do Vírus Sincicial Respiratório (VSR) e Metapneumovirus humano (hMPV)**

#### **Extração do ácido ribonucleico (RNA) – realizada pelo método do TRIzol® (Life Technologies)**

- 1) Adicionar 1 ml de TRIzol® a 250  $\mu$ L de amostra clínica diluída em MEM. Homogeneizar e manter em temperatura ambiente por 5 minutos.
- 2) Adicionar 200  $\mu$ L de clorofórmio a esta mistura e manter em repouso em temperatura ambiente por 3 minutos. Centrifugar a 1200 x g durante 15 minutos a 4°C.
- 3) Transferir o sobrenadante para novos tubos. Adicionar 500  $\mu$ L de isopropanol ao RNA precipitado e manter em temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugar a 1200 x g por 10 minutos a 4°C.
- 4) Descartar o sobrenadante. Lavar o precipitado, contendo RNA total, em etanol a 75% por centrifugação a 1200 x g por 2 minutos a 4°C.
- 5) Re-suspender em 20  $\mu$ L de água Milli-Q® (Millipore), tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), contendo 10 U de inibidor de RNase (RNaseOUT™, Invitrogen).

#### **Detecção do genoma do hMPV**

##### **I) Transcrição reversa**

- 1) Adicionar 5  $\mu$ L da suspensão de RNA extraído a um volume total de reação de 40  $\mu$ L contendo: tampão de reação (20 mM de tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl) (Invitrogen), 7,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 250  $\mu$ M de cada dNTP (Invitrogen), 25 ng do iniciador randômico pDN6™ (Random hexamer primers™ Amersham Bioscience) e 25 U da enzima Superscript™ II (Invitrogen).
- 2) Incubar esta mistura por 60 minutos a 42°C, seguido de 10 minutos a 95°C.

- 3) Manter o cDNA obtido (fita complementar de DNA) em temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização para reação da PCR.

## II) Reação em cadeia pela polimerase

- 1) Adicionar  $5\ \mu\text{L}$  do cDNA a um volume total de reação de  $50\ \mu\text{L}$  contendo: tampão de reação (20 mM de tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl) (Invitrogen), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen),  $200\ \mu\text{M}$  de cada dNTP (Invitrogen), 10 pmoles do iniciador direto N1 e do iniciador reverso N3 e 1 unidade de Taq Platinum<sup>TM</sup> DNA polimerase (Invitrogen).
- 2) Submeter esta mistura por 3 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$  e 35 ciclos de desnaturação de um minuto a  $94^{\circ}\text{C}$ , anelamento de 30 segundos a  $50^{\circ}\text{C}$  e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, seguido por uma extensão final de dez minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ , em termociclador *Perkin Elmer Gene Amp<sup>TM</sup> PCR System 2400*.

## III) Semi-nested PCR

- 1) Adicionar  $5\ \mu\text{L}$  do produto da primeira PCR a um volume total de reação de  $50\ \mu\text{L}$  contendo: tampão de reação (20 mM de tris-HCl, pH 8,4; 50 mM de KCl) (Invitrogen), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen),  $200\ \mu\text{M}$  de cada dNTP (Invitrogen), 10 pmoles do iniciador direto N2 e do iniciador reverso N3 e 1 unidade de Taq Platinum<sup>TM</sup> DNA polimerase (Invitrogen).
- 2) Submeter esta mistura ao mesmo programa de amplificação da primeira PCR.

## Detecção do genoma do VSR

### I) Transcrição reversa

1. Adicionar  $5\ \mu\text{L}$  da suspensão de RNA extraído a um volume total de reação de  $20\ \mu\text{L}$  contendo: 10 pmoles do iniciador LG3,  $500\ \mu\text{M}$  de cada dNTP (Invitrogen), 50 U da enzima Superscript<sup>TM</sup> II (Invitrogen), tampão de reação (250 mM de Tris-HCl pH 8,3, 375 mM de KCl, 15 mM de  $\text{MgCl}_2$ ) (Invitrogen) e 50mM de DTT (dithiotreitol) (Invitrogen).

2. Incubar esta mistura durante 60 minutos a 42<sup>0</sup>C seguido de 15 minutos a 70<sup>0</sup>C.
3. Manter o cDNA obtido em temperatura de -20<sup>0</sup>C até sua utilização para reação da PCR.

## II) Reação em cadeia pela polimerase

1. Adicionar 2  $\mu$ L de cDNA a um volume total de reação de 50  $\mu$ L contendo tampão de reação (20 mM de tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl) (Invitrogen), 1,2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 200  $\mu$ M de cada dNTP (Invitrogen), 10 pmoles de cada iniciador direto (LG5) e reverso (LG3), e 1 unidade de Taq Platinum<sup>TM</sup> DNA polimerase (Invitrogen).
2. Submeter esta mistura a temperatura de 95<sup>0</sup>C por 5 minutos e 35 ciclos de desnaturação de 1 minuto e 30 segundos a 94<sup>0</sup>C, anelamento de 1 minuto e 30 segundos a 71<sup>0</sup>C e extensão a 72<sup>0</sup>C por 1 minuto e 30 segundos, seguido por uma extensão final de 10 minutos a 72<sup>0</sup>C em termociclador *Perkin Elmer Gene Amp<sup>TM</sup> PCR System 2400*.

## III) Semi-nested PCR

1. Adicionar 2  $\mu$ L do produto da primeira PCR a um volume total de reação de 50  $\mu$ L contendo tampão de reação (20 mM de tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl) (Invitrogen), 1,2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 200  $\mu$ M de cada dNTP, 10 pmoles de cada iniciador direto (GA-480 ou GB-496) e do reverso (LG3), e 1 unidade de Taq Platinum<sup>TM</sup> DNA polimerase (Invitrogen).
2. Submeter esta mistura ao mesmo programa de amplificação da primeira PCR, exceto pela temperatura de anelamento que deverá ser de 62<sup>0</sup>C.

### **Eletroforese em gel de agarose - para a observação e análise dos resultados**

1. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  do produto amplificado na *snPCR* em 2  $\mu\text{L}$  do tampão de arrasto (azul de bromofenol 2,5% em glicerol 50%).
2. Aplicar em gel de agarose a 1,5% em tampão de corrida TBE (89 mM de Tris-Borato, 2 mM de EDTA) e submeter a uma diferença de potencial de 100 V por uma hora.
3. Imergir o gel em solução de brometo de etídio 0,5  $\mu\text{g/mL}$  sob suave agitação durante dez minutos.
4. Lavar o gel em água destilada por 15 min e visualizar em trans-iluminador de luz ultravioleta acoplado ao sistema *Eagle Eye*<sup>TM</sup> II de captura e documentação de imagem. Aplicar no gel de agarose um padrão de peso molecular (Marcador 100 pb, Invitrogen) para identificação do tamanho do produto.

### **Interpretação dos resultados**

A amostra será considerada positiva para hMPV caso apresente banda na posição correspondente a 928 pb e para o VSR na posição de 450 pb (iniciador GA480) e 434 pb (iniciador GB496).

## ANEXO 6

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezados pais ou responsáveis,

Este documento lhe fornecerá informações acerca do estudo e pedirá seu consentimento para que seu (sua), filho(a) possa participar de uma pesquisa que está sendo desenvolvida pelo Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) do Centro Biomédico (CBM), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), juntamente com a Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro.

Este estudo pretende conhecer os possíveis problemas respiratórios que podem ocorrer após um quadro de bronquiolite viral aguda, principalmente sibilância (“chiado”) recorrente. Para isto será necessária a coleta de secreção de nasofaringe mediante aspiração e responder a um questionário. Seu (sua), filho (a) será acompanhado (a) por um período de dois anos com consultas trimestrais no ambulatório anexo ao NDI.

Você tem o direito de solicitar outros esclarecimentos sobre a pesquisa e pode não concordar com a participação de seu (sua) filho (a) ou interrompê-la a qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo.

As informações que você nos der serão mantidas em sigilo e não serão divulgadas em qualquer hipótese. Os resultados deste estudo serão apresentados de forma conjunta, não sendo possível identificar os indivíduos que dele participarem.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto agora ou a qualquer momento.

Declaro estar ciente das informações deste Termo de Consentimento e autorizo a participação de meu (minha) filho (a) nesta pesquisa.

---

Nome e assinatura dos pais ou responsáveis

---

Nome e assinatura do entrevistador

**Coordenadora da pesquisa:** Dra. Rita Elizabeth Checon de Freitas Silva  
Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória – ES, CEP: 29040-091  
Fone: (27) 3335-7210 Fax: (27) 3335-7206

**Comitê de Ética em Pesquisa do CBM – UFES:**  
Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória – ES, CEP: 29040-091  
Fone: (27) 3335-7210 Fax: (27) 3335-7206

## ANEXO 7

**Descrição dos participantes do estudo segundo o número de episódios de sibilância recorrentes (ESR) e tempo, em anos, de participação no estudo**

Participante	Número de ESR	Tempo (em anos)	Participante	Número de ESR	Tempo (em anos)
1	8	2,44	39	1	1,31
2	3	0,96	40	4	1,52
3	4	1,39	41	5	1,41
4	1	1,22	42	2	0,36
5	3	1,74	43	6	1,25
6	2	1,43	44	8	1,29
7	7	2,42	45	2	1,37
8	9	1,75	46	6	1,20
9	3	1,28	47	3	1,33
10	1	1,51	48	3	1,11
11	1	0,64	49	4	1,35
12	13	1,54	50	5	1,33
13	15	1,75	51	3	1,06
14	5	1,58	52	9	1,33
15	4	1,24	53	6	1,33
16	5	1,28	54	1	1,33
17	0	1,22	55	7	0,93
18	1	1,43	56	6	1,14
19	0	0,67	57	6	1,02
20	1	0,67	58	10	0,93
21	5	2,32	59	6	1,36
22	6	2,14	60	3	0,50
23	11	2,35	61	3	0,97
24	14	1,98	62	2	1,17
25	5	1,95	63	3	0,93
26	3	1,12	64	5	1,24
27	4	0,48	65	4	1,27
28	5	0,98	66	3	1,07
29	5	1,50	67	5	1,24
30	6	1,26	68	5	1,02
31	3	0,49	69	3	1,18
32	1	1,31	70	3	1,24
33	1	0,55	71	0	0,36
34	9	1,87	72	1	0,92
35	7	1,25	73	7	1,00
36	1	1,42	74	3	1,05
37	8	1,07	75	8	1,08
38	6	1,42	76	7	0,65

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Acute respiratory infections in children. [http://www.who.int/fch/depts/cah/resp\\_infections/en/](http://www.who.int/fch/depts/cah/resp_infections/en/) (acessado em 14/Dez/2006).
2. Pan American Health Organization. Charts on the morbidity situation of children under five in the region of the Americas. [http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/ira\\_aris.htm](http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/ira_aris.htm) (acessado em 03/Mar/2007).
3. Selwin BJ. The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: comparison of findings from several developing countries. *Reviews Infect Dis* 1990; 12 Suppl 8:870-88.
4. Berman S. Epidemiology of acute respiratory infections in children of developing countries. *Reviews Infect Dis* 1991; 13 Suppl 6:454-62.
5. Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health* 1998; 3:268-80.
6. Parrot RH, Kim HW, Arrobio JO, Hodes DS, Murphy BR, Brandt CD, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D. C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. *Am J Epidemiol* 1973; 98:289-300.
7. Glezen WP, Denny FW. Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. *N Engl J Med* 1973; 288:498-504.
8. Smith RL, Openshaw PJM. Bronchiolitis. *Lancet* 2006; 368:312-22.
9. Morris JA, Blount Jr. RE, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Bio Med* 1956; 92:544-9.
10. World Health Organization. Respiratory Syncytial Virus. [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/ari/en/index3.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index3.html) (acessado em 14/Dez/2006).

11. Wertz GW, Moudy RM. Antigenic and genetic variation in human respiratory syncytial virus. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23:S19-24.
12. Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:1-15.
13. Mufson MA, Örvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1985; 66:2111-24.
14. Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF Stone Y, McIntosh K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1985; 151:626-33.
15. Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:5625-9.
16. Sullender WM, Anderson LJ, Mufson MA, Wertz GW. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J Virol* 1991; 65:5425-34.
17. Cane PA, Pringle. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: rapid identification of subgroup A lineages. *J Virol Methods* 1992; 40:297-306.
18. Hall CB. Respiratory syncytial virus: a continuing culprit and conundrum. *J Pediatr* 1999; 135:2-7.
19. Waris M. Pattern of respiratory syncytial virus epidemics in Finland: two-year cycles with alternating prevalence of groups A and B. *J Infect Dis* 1991;163:464-69.
20. Stralioetto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha ML, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35:283-91.
21. Moura FE, Nunes IF, Silva GB Jr, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus infections in northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74:165-7.

22. Nascimento JP, Siqueira MM, Sutmöller F, Krawczuk MM, Farias V, Ferreira V, et al. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 33:287-96.
23. Vieira SE, Stewien KE, Queiroz DA, Durigon EL, Torok TJ, Anderson LJ et al. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2001; 43:125-31.
24. Checon RE, Siqueira MM, Lugon AK, Portes S, Dietze R. Short report: seasonal pattern of respiratory syncytial virus in a region with a tropical climate in southeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67:490-1.
25. Mufson MA, Belshe RB, Örvell C, Norby E. Respiratory syncytial virus epidemics: variable dominance of subgroups A and B strains among children, 1981-1986. *J Infect Dis* 1988; 157:143-8.
26. Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW et al. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis* 1990; 162:1283-90.
27. Siqueira MM, Nascimento JP, Anderson LJ. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus group A and B isolates in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 1991; 29:557-9.
28. Arbiza J, Delfraro A, Frabasile S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001 – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2005; 100:221-30.
29. Mufson MA, Akerlind-Stopner B, Örvell C, Belshe RB, Norrby E. A single-season epidemic with respiratory syncytial virus subgroup B2 during 10 epidemic years, 1978 to 1988. *J Clin Microbiol* 1991; 29:162-5.

30. Coggins WB, Lefkowitz E, Sullender M. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3552-7.
31. Muelenaer PM, Henderson FW, Hemming VG, Walsh EE, Anderson LJ, Prince GA, Murphy BR. Group-specific serum antibody responses in children with primary and recurrent respiratory syncytial virus infections. *J Infect Dis* 1991; 164:15-21.
32. Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Analysis of relatedness of subgroup A respiratory syncytial viruses isolated worldwide. *Virus Res* 1992; 25:15-22.
33. Zlateva KT, Lemey P, Moës E, Vandamme A, Ranst MV. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol* 2005; 79:9157-67.
34. Cane PA, Pringle CR. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *J Virol* 1995; 69:2918-25.
35. Henderson FW, Clyde Jr. WA, Collier AM, Denny FW, Senior RJ, Sheaffer CI, et al. The etiologic and epidemiologic spectrum of bronchiolitis in pediatric practice. *J Pediatr* 1979; 95:183-90.
36. Mufson MA, Belshe RB, Örvell C, Norrby E. Subgroup characteristics of respiratory syncytial virus strains recovered from children with two consecutive infections. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1535-9.
37. Parveen S, Broor S, Kapoor SK, Fowler K, Sullender M. Genetic diversity among respiratory syncytial viruses that have caused repeated infections in children from rural India. *J Med Virol* 2006; 78:659-65.
38. Kim HW, Arrobio JO, Brandt CD, Jeffries BC, Pyles G, Reid JL, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D. C. I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. *Am J Epidemiol* 1973; 98:216-25.

39. Iwane MK, Edwards KM, Szilagyi PG, Walker FJ, Griffin MR, Weinberg GA, et al. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus and parainfluenza viruses among young children. *Pediatrics* 2004; 113:1758-64.
40. Hall CB, McCarthy CA. Respiratory syncytial virus. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R, ed. *Principles and Practice of Infections Diseases*. 4. ed. New York: Churchill Livingstone; 1995. v. 2. p. 1501-19.
41. Suttmöller F, Andrade Ferro ZP, Asensi MD, Ferreira V, Mazzei IS, Cunha BL. Etiology of acute respiratory tract infections among children in a combined community and hospital study in Rio de Janeiro. *Clin Infect Dis* 1995; 20:854-60.
42. Stralioatto SM, Nestor SM, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96:155-8.
43. Cintra OAL, Owa MA, Machado AA, Cervi MC, Figueiredo LTM, Rocha GM, et al. Occurrence and severity of infections caused by subgroup A and B respiratory syncytial virus in children in southeast Brazil. *J Med Virol*. 2001; 65:408-12.
44. Stang P, Brandenburg N, Carter B. The economic burden of respiratory syncytial virus-associated bronchiolitis hospitalizations. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001; 155:95-6.
45. American Academy of Pediatrics. Diagnosis and management of bronchiolitis. <http://www.pediatrics.org> (acessado em 04/Fev/2007).
46. Price, JF. Acute and long-term effects of viral bronchiolitis on infancy. *Lung*. 1990; 168 Suppl: 414-21.
47. Black-Payne C. Bronchiolitis. In: Hilman BC, ed. *Pediatric Respiratory Disease: Diagnosis and Treatment*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1993. p. 205-18.
48. Fischer GB. Bronquiolite viral aguda. In: Rozov T, organizadora. *Doenças Pulmonares em Pediatria: diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Editora Atheneu; 1999. p. 193-8.

49. Hall CB. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the “cold war” has not ended. *Clin Infect Dis* 2000; 31:590-6.
50. Hall C, Douglas RJ. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr* 1981; 99:100-3.
51. Panitch HB. Bronchiolitis in infants. *Curr Opin Ped* 2001; 13:256-60.
52. Wittig HJ, Cranford NJ, Glaser J. The relationship between bronchiolitis and childhood asthma. *J Allergy* 1959; 30:19-23.
53. Eisen AH, Bacal HL. The relationship of acute bronchiolitis to bronchial asthma – a 4-to-14 year follow-up. *Pediatrics* 1963; 31:859-61.
54. Hyde JS, Saed AM. Acute bronchiolitis and the asthmatic child. *J Asthma Res* 1966; 4:137-54.
55. Zweiman B, Schoenwetter WF, Hildreth EA. The relationship between bronchiolitis and allergy asthma: a prospective study with allergy evaluation. *J Allergy* 1966; 37:48-53.
56. Rooney JC, Williams HE. The relationship between proved viral bronchiolitis and subsequent wheezing. *J Pediatr* 1971; 79:744-7.
57. Kneyber MCJ, Steyerberg EW, de Groot R, Moll HA. Long-term effects of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in infants and young children: a quantitative review. *Acta Paediatr* 2000; 89:654-60.
58. Sims DG, Downham MAPS, Gardner PS, Webb JKG, Weightman D. Study of 8-year-old children with a history of respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy. *Br Med J* 1978; 1:11-4.
59. Pullan CR, Hey EN. Wheezing, asthma, and pulmonary dysfunction 10 years after infection with respiratory syncytial virus in infancy. *Br Med J* 1982; 284:1665-9.
60. Hall CB, Hall WJ, Gala CL, Magill FB, Leddy JP. Long-term prospective study in children after respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* 1984; 105:358-64.

61. Sly PD, Hibbert ME. Childhood asthma following hospitalization with acute viral bronchiolitis in infancy. *Pediatr Pulmonol.* 1989; 7:153-8.
62. Osundwa VM, Dawod ST, Ehlayel M. Recurrent wheezing in children with respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in Qatar. *Eur J Pediatr* 1993; 152:1001-3.
63. Bont L, Van Aaldern WMC, Versteegh J, Brus F, Draaisma JTM, Pekelharing-Berghuis M, et al. Airflow limitation during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection predicts recurrent wheezing. *Pediatr Infect Dis* 2001; 20:277-82.
64. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B, Bjorksten B. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics.* 1995; 95:500-5.
65. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:1501-7.
66. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171:137-41.
67. Cifuentes L, Caussade S, Villagrán C, Darrigrande P, Bedregal P, Valdivia G, et al. Risk factors for recurrent wheezing acute bronchiolitis: a 12-month follow-up. *Pediatr Pulmonol* 2003; 36:316-21.
68. Albernaz EP, Menezes AMB, César JA, Victora CG, Barros FC. Hospitalização por bronquiolite aguda como fator de risco para sibilância recorrente. *Cadernos de Saúde Pública* 2000; 16:1049-57.
69. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999; 354:541-5.

70. Schauer U, Hoffjan S, Bittscheidt J, Köchling A, Hemmis S, Bongartz S et al. RSV bronchiolitis and risk of wheeze and allergic sensitization in the first year of life. *Eur Respir J*. 2002; 20:1277-83.
71. Stein RT, Martinez FD. Asthma phenotypes in childhood: lessons from an epidemiological approach. *Paed Resp Rev* 2004; 5:155-61.
72. Martinez FD, Morgan WJ, Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM. Diminished lung function as a predisposing factor for wheezing respiratory illness in infants. *N Engl J Med* 1988; 319:1112-7.
73. Martinez FD, Helms PJ. Types of asthma and wheezing. *Eur Respir J* 1998; Suppl 12:3-8.
74. Sigurs N. A cohort of children hospitalized with acute RSV bronchiolitis: impact on later respiratory disease. *Paediatr Respir Rev* 2002; 3:177-83.
75. Welliver RC, Duffy L. The relationship of RSV-specific immunoglobulin E antibody responses in infancy, recurrent wheezing, and pulmonary function at age 7-8 years. *Pediatr Pulmonol* 1993; 15:19-27.
76. Wennergren G, Kristjánsson S. Relationship between respiratory syncytial virus bronchiolitis and future obstructive airway diseases. *Eur Respir J* 2001; 18:1044-58.
77. Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev* 2004; 5 (Suppl A):119-26.
78. Fonseca CB, Grisi S. Bronchiolitis, respiratory syncytial virus and recurrent wheezing: what is the relationship? *Rev Hosp Clin Fac Med S. Paulo* 2003; 58:39-48.
79. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:633-9.

80. Weber MW, Milligan P, Giadom B, Pate MA, Kwara A, Sadiq AD, et al. Respiratory illness after severe respiratory syncytial virus disease in infancy in the Gambia. *J Pediatr* 1999; 135:683-8.
81. Galiano MC, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). *J Clin Microbiol* 2005; 43:2266-73.
82. Côte S, Abed Y, Boivin G. Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3631-5.
83. III Congresso Brasileiro no Manejo da Asma. *J Pneumologia* 2002; 28 (1 Suppl):6-8.
84. Zhang L, Ferruzzi E, Bonfanti T, Auler MI, D'ávila NE, Faria CS, et al. Long and short-term effect of prednisolone in hospitalized infants with acute bronchiolitis. *J Paediatr Child Health* 2003; 39:548-51.
85. Prietsch SOM, Fischer GB, César JA, Cervo PV, Sangaletti LL, Wietzycoski CR, et al. Fatores de risco para sibilância recorrente em menores de 13 anos no sul do Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 2006; 20:331-7.
86. Cardoso MRA, Cousons SN, Alves FM, Ribeiro MMM, Abreu Neto BP. Diagnosis and prognosis of wheezing disorders in young children in the city of São Paulo, southeast Brazil. *Acta Paediatr* 2000; 89:1484-9.
87. Fischer GB, Teper A, Colom AJ. Acute viral bronchiolitis and its sequelae in developing countries. *Paediatr Respir Rev* 2002; 3:298-302.
88. Pereira MU, Sly PD, Pitrez PM, Jones MH, Escouto D, Dias AC, et al. Non-atopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *Eur Respir J*. No prelo 2007
89. Bont L, van Aalderen WMC, Kimpen JLL. Long-term consequences of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Paediatr Respir Rev*. 2000; 1:221-7.

90. Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1992;70:699-703.
91. Tristram DA, Welliver RC. Respiratory syncytial virus. In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, ed. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 7. ed. Washington: American Public Health Association; 1995. p. 539-52.
92. Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2990-5.
93. Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR, et al. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. *J Infect Dis* 2004; 189:706-10.
94. Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 2004; 38:983-90.
95. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7:719-24.
96. Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:1626-8.
97. Freymouth F, Vabret A, Legrand L, Etteradossi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, Guillois B. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:92-4.
98. Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, Tsolia M, Gourgiotis D, Liapi-Adamidou G, Constantopoulos AG, Kafetzis D, Papadopoulos NG. Human Metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. *J Clin Virol* 2004; 30:267-70.

99. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE Jr. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004; 350:443-50.
100. Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States, clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 2003; 111:1407-10.
101. Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, Lanini L, Andreoli E, Ragazzo V, Pistello M, Specter S, Bendinelli M. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2987-91.
102. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, Shears P, Smyth RL, Hart CA. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005; 191:382-6.
103. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:372-5.
104. Konig B, Konig W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4632-5.
105. Lazar I, Weibel C, Dziura J, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Human metapneumovirus and severity of respiratory syncytial virus disease. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1318-20.
106. Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:242-64.

107. Pitrez PMC, Stein RT, Stuermer L, Macedo IS, Schmitt VM, Jones MH, et al. Rhinovirus and acute bronchiolitis in young infants. *J Pediatr (Rio J)* 2005; 81:417-20.
108. Waris M, White LJ. Seasonality of respiratory syncytial virus infection *Clin Infect Dis* 2006; 43:541.
109. Rossi GA, Medici MC, Arcangeletti MC, Lanari M, Merolla R, Paparatti UDL, et al. Risk factors for severe RSV-induced lower respiratory tract infection over four consecutive epidemics. *Eur J Pediatr*. No prelo 2007
110. Openshaw PJM, Dean GS, Culley FJ. Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: clinical and research approaches. *Pediatr Infect Dis* 2003; 22 (2 Suppl):58-65.
111. Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Group health medical associates. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol* 1991; 133:1135-50.
112. Hall CB, Geiman JM, Biggar R, Kotok DI, Hogan PM, Douglas Jr. RG. Respiratory syncytial virus infections within families. *N Engl J Med* 1976; 294:414-9.
113. Monto AS, Lim SK. The Tecumseh study of respiratory illness. iii. Incidence and periodicity of respiratory syncytial virus and *mycoplasma pneumoniae* infections. *Am J Epidemiol* 1971; 94:290-301.
114. Riccetto AGL, Ribeiro JD, Silva MTN, Almeida RS, Arns CW, Baracat ECE. Respiratory syncytial virus (RSV) in infants hospitalized for acute lower respiratory tract disease: incidence and associated risks. *Braz J Infect Dis* 2006; 10:357-61.
115. Albernaz EP, Menezes AMB, César JA, Victora CG, Barros FC, Halpern R. Fatores de risco associados a hospitalização por bronquiolite aguda no período pós-neonatal. *Rev Saúde Pública* 2003; 37:485-93.

116. Simoes EAF. Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. *J Pediatr* 2003; 143 (5 Suppl):118-26.
117. Weber MW, Milligan P, Hilton S, Lahai G, Whittle H, Mulholland EK, et al. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection leading to hospital admission in children in the western region of the Gambia. *Int J Epidemiol* 1999; 28:157-62.
118. Henderson J, Hilliard TN, Scherriff A, Stalker D, Shammari N, Thomas HM 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.* 2005; 16:386-92.
119. Bont L, Steijn M, van Aalderen WMC, Kimpen JLL. Impact of wheezing after respiratory syncytial virus infection on health-related quality of life. *Pediatr Infect Dis J.* 2004; 23:414-17.
120. Welliver RC, Sun M, Rinaldo D, Ogra PL. Predictive value of respiratory syncytial virus-specific IgE responses for recurrent wheezing following bronchiolitis. *J Pediatr* 1986; 109:776-80.
121. Stein RT, Holberg CJ, Sherrill D, Wright AL, Morgan WJ, Taussig L, et al. Influence of parental smoking on symptoms during the first decade of life. *Am J Epidemiol* 1999; 149:1030-7.
122. Hanrahan JP, Tager IB, Segal MR, Tosteson TD, Castile RG, Van Vunakis H, et al. The effects of maternal smoking during pregnancy on early lung function. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:1129-35.
123. Sims DG, Gardner PS, Weightman D, Turner MW, Soothill JF. Atopy does not predispose to RSV bronchiolitis or postbronchiolitic wheezing. *British Med J* 1981; 282:2086-8.
124. Reichenheim ME, Moraes CL. Alguns pilares para a apreciação da validade de estudos epidemiológicos. *Rev Bras Epidemiol* 1998; 1:131-48.